

Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Célia Regina Diniz

TÉCNICAS DE MICROBIOLOGIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

 eduepb



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

Antonio Guedes Rangel Junior | *Reitor*

Flávio Romero Guimarães | *Vice-Reitor*



EDITORA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

Diretor

Luciano do Nascimento Silva

Editores Assistentes

Antonio Roberto Faustino da Costa

Cidoval Moraes de Sousa

Conselho Editorial

Presidente

Luciano do Nascimento Silva

Conselho Científico

Alberto Soares Melo

Cidoval Moraes de Sousa

Hermes Magalhães Tavares

José Esteban Castro

José Etham de Lucena Barbosa

José Tavares de Sousa

Marcionila Fernandes

Olival Freire Jr

Roberto Mauro Cortez Motta



Editora filiada a ABEU

EDITORA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário - Campina Grande-PB - CEP 58429-500

Fone/Fax: (83) 3315-3381 - <http://eduepb.uepb.edu.br> - email: eduepb@uepb.edu.br

Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Célia Regina Diniz

Técnicas de Microbiologia Sanitária e Ambiental



Campina Grande-PB
2017

Copyright © EDUEPB

A reprodução não-autorizada desta publicação, por qualquer meio, seja total ou parcial, constitui violação da Lei nº 9.610/98.

Editora da Universidade Estadual da Paraíba

Luciano do Nascimento Silva | *Diretor*

Design Gráfico

Erick Ferreira Cabral

Jefferson Ricardo Lima Araujo Nunes

Leonardo Ramos Araujo

Comercialização e Distribuição

Danielle Correia Gomes

Divulgação

Zoraide Barbosa de Oliveira Pereira

Revisão Linguística

Elizete Amaral de Medeiros

Normalização Técnica

Jane Pompilo dos Santos

Depósito legal na Biblioteca Nacional, conforme Lei nº 10.994, de 14 de dezembro de 2004.
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL - UEPB

C387t Ceballos, Beatriz Susana Ovruski de.

Técnicas de microbiologia sanitária e ambiental. /Beatriz Susana Ovruski de Ceballos, Célia Regina Diniz. - Campina Grande: EDUEPB, 2017.

11000kb. 324 p.: il.

Modo de Acesso: World Wide Web www.uepb.edu.br/ebooks/

ISBN 978-85-7879-285-5

ISBN E-BOOK 978-85-7879-286-2

1. Microbiologia. 2. Água. 3. Saúde. 4. Doenças. 5. Poluição. 6. Bactérias. 7. Micro-organismos. 8. Contaminação. 9. Doenças de origem hídrica. I. Título.

21. ed. **CDD 579**

Sumário

Introdução.....	7
Capítulo 1 - Água e Saúde: doenças de origem hídrica, relacionadas e veiculadas pela água	11
Capítulo 2 - Indicadores Microbiológicos de Poluição	41
Capítulo 3 - Indicadores microbianos de contaminação fecal	55
Capítulo 4 - Introdução às práticas de Microbiologia Sanitária e Ambiental	101
Capítulo 5 - Técnicas de isolamento, quantificação e identificação das populações microbianas	133
Capítulo 6 - Técnicas de amostragem de águas para análises microbiológicas	155
Capítulo 7 - Contagem padrão de bactérias ou contagem de bactérias totais ou contagem de bactérias heterótrofas	171
Capítulo 8 - Teste de Presença-Ausência (P/A).....	199
Capítulo 9 - Técnica dos tubos múltiplos para coliformes totais, coliformes termotolerantes (ex-fecais) e <i>Escherichia coli</i>	221

Capítulo 10 - Técnica da membrana filtrante	251
Capítulo 11 - Testes de substratos enzimáticos definidos para coliformes (testes rápidos)	269
Capítulo 12 - Detecção e quantificação de protozoários em águas superficiais e potáveis	283

Introdução

A ideia de elaborar este manual surgiu muitos anos atrás, frente à necessidade de disponibilizar um texto de consulta simplificado e ilustrado para os alunos universitários das disciplinas de Microbiologia Ambiental e de Microbiologia Sanitária e Ambiental, sobre os fundamentos e as técnicas de identificação e quantificação de microrganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos relacionados com água, esgotos domésticos e lodos de esgotos, entre outras matrizes ambientais. Reforçamos a ideia ao verificar, durante pesquisas em municípios do interior do Estado, que seria também bem recebido nos laboratórios regionais que trabalham com água.

Ao longo desse tempo, foram redigidas diversas apostilas avulsas e numerosos apontamentos de aulas práticas, aqui organizados e atualizados, com destaque para as análises bacteriológicas de amostras de água de mananciais superficiais e de água potável e consumo humano em geral. Justifica-se a escolha o fato de as primeiras serem as principais fontes de água no país e em particular no Nordeste para usos múltiplos, e a importância do controle da qualidade microbiológica das águas para consumo humano.

Foram incluídas técnicas de detecção e de quantificação de protozoários patogênicos em águas que complementam os estudos de indicadores sanitários da qualidade das águas destinadas ao consumo humano de acordo com a Portaria N^o 2914 do Ministério da Saúde de dezembro de 2011.

Nesse contexto, são descritas técnicas de coleta de amostras de água de mananciais lênticos (lagos, represas ou “açudes”) e lóticos (rios). São apresentadas as técnicas mais frequentemente usadas na detecção e quantificação de microrganismos indicadores de contaminação fecal. Dentre estes, destacam-se, pela sua ampla aplicabilidade, bactérias (principalmente coliformes, *Escherichia coli*, enterococos, estreptococos), cistos e oocistos de protozoários. Esses microrganismos indicam o nível de risco à saúde ao qual está exposta à população usuária de uma água, em contato com os esgotos e com os efluentes de seu tratamento e de um solo contaminado, entre outros ambientes.

Bactérias, cistos e oocistos de protozoários são usados para monitorar e controlar a eficiência do tratamento das Estações de Tratamento de Água (ETAs) e da qualidade da água distribuída pelas redes coletivas de águas destinadas ao consumo humano por sistemas e soluções alternativas (coletivas e individuais) de abastecimento de água, entre elas, as distribuídas pelos carros-pipas das operações emergenciais.

Nas águas dos mananciais superficiais e subterrâneos, as concentrações das bactérias indicadoras de contaminação fecal são fundamentais para definir os usos dessas águas, tais como:

- a viabilidade de produção de água potável (potabilização) e tipo de tratamento a ser aplicado para tal fim;
- consumo animal, aquicultura, irrigação restrita ou irrestrita, entre outros;
- balneabilidade e uso em recreação em geral.

A classificação dos corpos de água superficiais do território nacional segundo sua qualidade e a determinação de seus usos são normatizados pela Resolução CONAMA Nº 357

de 17 de março de 2005 e a Resolução CONAMA N° 274 de 29 de novembro de 2000 que legislam sobre o uso das águas superficiais para recreação com base nas concentrações de coliformes e estreptococos fecais ou enterococos.

Organizado em 12 capítulos, o manual faz referência às doenças de veiculação hídrica, ao descobrimento e aos usos das bactérias coliformes como indicadores universais de poluição fecal, à evolução destes indicadores, às suas vantagens e limitações, e às necessidades do uso de outros indicadores microbianos complementares em casos específicos, como águas salinas. Citam-se e explicam-se metodologias de amostragens, de preservação das amostras e do seu processamento. São descritas as técnicas mais frequentes para sua quantificação e identificação seguindo uma ordem cronológica de desenvolvimento e aperfeiçoamento das análises realizadas na rotina de um laboratório de microbiologia de água, de esgotos e de análises ambientais, em geral, no contexto de detecção da contaminação fecal e de seu controle.

Assim, são descritos métodos tradicionais de quantificação como a Técnica de Contagem Padrão de Bactérias Heterótrofas, a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para a identificação e quantificação de bactérias coliformes totais e coliformes termotolerantes (ex.: coliformes fecais), complementada com testes de identificação de *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de águas de diversas origens; a Técnica de Membrana de Filtração ou Membrana Filtrante para os mesmos microrganismos.

São detalhadas técnicas mais modernas e rápidas, como o Método de Substrato Definido ou de Substrato Cromogênico, difundido mundialmente pelo nome da marca que registrou inicialmente o produto e evidenciou um processo metodológico simples (Colilert^(R)). Este inclui testes de presença e ausência e de quantificação e identificação de coliformes com

aplicação do método estatístico de Número Mais Provável transformando a leitura dos “tubos múltiplos” em cartelas de dupla entrada. São também apresentados outros métodos rápidos como o Petrifilm EC (Placa 3M Petrifilm™) e os “deep slides”, para leituras rápidas e aproximadas de concentração de bactérias indicadoras.

Dentre as referências bibliográficas utilizadas, destacam-se o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, o *Manual Prático de Análises de Água - Fundação Nacional de Saúde*, várias Normas Técnicas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), cartilhas e referências dos fornecedores de meios de cultura e equipamentos.

Disponibilizamos assim este manual com os ensejos de que seja útil aos estudantes, técnicos e colegas que ensinam e pesquisam na área da Microbiologia Sanitária e Ambiental e aos técnicos de laboratórios de águas do Estado.

Boa leitura e bom trabalho laboratorial!

Campina Grande, dezembro de 2016.

Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Célia Regina Diniz

CAPÍTULO 1

Água e Saúde: doenças de origem hídrica, relacionadas e veiculadas pela água

O planeta Terra possui mais de 75% de sua superfície ocupada por água, sendo 97,5% águas salgadas dos oceanos e dos mares. Apenas 2,5% das águas são doces e destas 0,77% são diretamente aproveitáveis pelo homem, distribuídas em rios, lagos e águas subterrâneas, o restante 1,77% se encontra nas geleiras e calotas polares, de difícil acesso e transporte (REBOUÇAS; BRAGA; TUNDISI, 2006).

A água é o elemento inorgânico mais abundante dos organismos vivos e essencial para sua sobrevivência. Representa entre 60 a 90% do peso dos seres vivos: nos humanos adultos, essa porcentagem é em média de 65% e em torno de 85% no recém-nascido. Em alguns organismos marinhos, ultrapassa 90% e 95% (nas medusas), assim como é elevado em vegetais (tubérculos da batata, 78%) e algumas frutas (tomate, 95%) (BRANCO, 1993; GRASSI, 2001).

A água é o veículo e o solvente universal dos componentes orgânicos e inorgânicos do ambiente e dos constituintes das células, mantém o tamanho e a forma celular, faz parte de todos os líquidos orgânicos vitais ao funcionamento dos seres vivos como o sangue, a urina, a linfa e o suor, regula a temperatura corporal e celular e intervém em todas as transformações que ocorrem continuamente nos processos

metabólicos dos organismos vivos, que se expressam no crescimento e na multiplicação das células e, portanto, na homeostase dos indivíduos.

Mas, se poluída com substâncias tóxicas ou com excesso de alguns elementos químicos como cálcio, ferro, selênio, bário, entre outros, e contaminada com microrganismos patogênicos, é um dos mais importantes veículos de enfermidades, com destaque para as doenças diarreicas de origem infecciosa. Nesse contexto, a avaliação da qualidade microbiológica da água se torna primordial à saúde pública.

A qualidade das águas naturais está fortemente influenciada pela sua capacidade de diluição e seu poder solvente sobre os materiais que escoam da bacia hidrográfica e, por essa interação, a qualidade da água expressa as atividades desenvolvidas na bacia hidrográfica (VOLLENWEIDER, 1965).

Os impactos humanos sobre os solos e os ambientes hídricos se iniciaram com as origens do homem, e se incrementaram com sua passagem da vida nômade à sedentária, cerca de 12.000 a 10.000 anos atrás, no período neolítico. O homem caçador-coletor dominou a agricultura ao domesticar os grãos dos cereais, aprendeu a semear e a coletar. Estimulados pela capacidade em produzir alimentos e não apenas coletá-los, os primeiros assentamentos humanos ocorreram nas proximidades das fontes de água, possivelmente perto do Mar Morto. Água em quantidade era primordial para satisfazer as necessidades de consumo, irrigação agrícola e dessedentação animal entre outros usos, não sendo relevante, naquela época, a qualidade, embora fossem escolhidas, intuitivamente, as águas mais limpas e claras, de bom sabor e sem odor, as quais eram abundantes (CEBALLOS; DANIEL; BASTOS, 2009).

Nesses primórdios da civilização, quando os agrupamentos humanos eram pequenos, o efeito do lançamento de

dejetos nos corpos de água era mínimo e não percebido pelo homem. O aumento populacional desses assentamentos, mais tarde, acentuou a contaminação das águas ao longo do tempo e sua deterioração foi percebida, primeiro, pela alteração das características organolépticas.

Possivelmente o primeiro registro de uma metodologia sistematizada para tratar a água para consumo humano foi um documento indiano de mais 4.000 anos que recomenda sua fervura, a introdução por repetidas vezes de barras de cobre aquecidas na água e sua exposição ao sol, seguidas de filtração e resfriamento em potes de cerâmica. O uso de alumínio para remover sólidos por coagulação e sedimentação teria surgido no Egito, 1.500 anos atrás (BAKER; TARAS, 1981).

Séculos passaram até o homem perceber que não era suficiente para usar uma água com segurança, verificar apenas sua transparência, cor, odor e sabor. Somente no século XIX, em 1840, John Snow, ao estudar as epidemias de cólera em Londres, confirmou a transmissão da doença pela água contaminada com fezes dos doentes (SNOW, 1990). Poucos anos depois, em 1864, Louis Pasteur propôs a teoria microbiana das doenças (um germe – uma doença) e forneceu evidências científicas para o reconhecimento da associação entre qualidade da água e saúde pública.

Esses conhecimentos estimularam o desenvolvimento de técnicas diversas de tratamento de água. A fervura foi e é o método mais antigo e bastante eficiente de tratamento da água para eliminar os contaminantes microbianos, mas está limitada à escala familiar. Em 1870, estendeu-se o uso de filtros de areia e de outras técnicas simples que ainda buscavam melhorar o aspecto estético da água e seu sabor e eliminar o odor. Os avanços do conhecimento e das tecnologias permitiram orientar o tratamento da água à eliminação de microrganismos para proteção à saúde.

Até os inícios do século XX, não havia padrões para avaliar a qualidade microbiológica da água de consumo humano. Foi em 1990 que Theodor Escherich descobriu os coliformes no intestino grosso de humanos com e sem diarreia e que logo foram aplicados como indicadores de contaminação de fekal de animais homeotermos nas águas. Em 1890, a *United States Public Health Service* (USPHS) dos Estados Unidos propôs a padronização das técnicas para a avaliação da qualidade da água e entre elas as análises bacteriológicas. Esse trabalho foi a base para a primeira edição, em 1905, do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. A importância desses padrões técnicos continua até hoje, estando em circulação a mais nova Edição, número 22, de 2012.

Doenças de origem hídrica e de veiculação hídrica

Em geral, as doenças relacionadas com a água são classificadas em dois grandes grupos: doenças de origem hídrica e doenças de veiculação hídrica (BRANCO, 1986; BRANCO, 1993).

Doenças de Origem Hídrica: enfermidades causadas por substâncias químicas (orgânicas ou inorgânicas) presentes na água em concentrações elevadas (superiores aos Valores Máximos Permitidos - VMP) pela legislação específica - para água potável: a Portaria 2914/2011 – MS, que causam danos graves à saúde (BRASIL, 2011). São exemplos:

- **Compostos Orgânicos** como pesticidas tóxicos: VMP - DDT1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; Endrin 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Malation 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Trihalometanos 0,1 mg.L^{-1} (propriedades mutagênicas e carcinogênicas - clorofórmio), Hidrocarbonos Polinucleares Aromáticos (PAHs), entre outros;
- **Elementos Inorgânicos:** Antimônio (Sb), Arsênico (Ar), Bário (Ba), Berilo (Be), Cádmio (Cd), Cobalto (Co), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg), Molibdênio (Mo),

Selênio (Se) , Urânio, elementos tóxicos cujos VMP em água para consumo humano variam de: 0,001mg.L⁻¹ para o Hg; 0,005mg.L⁻¹ para Cd; 0,001mg.L⁻¹ para Se; 0,001 mg.L⁻¹ para Pb; e 0,7mg.L⁻¹ para Ba.

As formas de ação destes elementos no metabolismo celular são semelhantes, por competirem com macronutrientes como o fósforo como ocorre com Ar e Sb e ambos inibem a glicólise, diminuem a produção de ATP e afetam a respiração e o funcionamento cardiovascular; o Hg possui grande afinidade pelo enxofre dos grupos HS⁻ das proteínas e inativas enzimas do sistema nervoso que afetam também o sistema respiratório; Pb e Ba substituem o Ca e podem ser acumulados nos ossos, sendo a causa de fragilidade do esqueleto; o Ba pode provocar gastroenterites, fraqueza, paralisia de membros, diminuição da frequência cardíaca, parada do coração e morte. Pb age de forma parecida, além de substituir também Zn, Fe e Mg, afetando o sistema nervoso, podendo levar à demência e morte. O Cd é absorvido por ser confundido com Zn por algumas células e afetar o fígado, além de causar sintomas parecidos com a intoxicação por Hg.

Nitratos em concentrações superiores a 10 mg.L⁻¹ são tóxicos ao favorecer a transformação da molécula de hemoglobina em meta-hemoglobina. Os nitratos em excesso são reduzidos no interior corporal a nitritos, os quais se reoxidam usando oxigênio transportado pela hemoglobina que ao perder oxigênio se transforma em meta-hemoglobina. Essa transformação diminui a concentração de oxigênio transportado pelo sangue que ainda pode ser incapaz de liberar efetivamente o oxigênio para os tecidos corporais e em lactentes causa a doença conhecida como metemoglobinemia infantil que pode levar a morte por asfixia (síndrome do bebê azul). Também se apresenta de forma drástica em indivíduos deficientes em vitamina C.

Níveis excessivos de nitrato foram associados com o câncer gástrico: os nitritos produzem agentes nitrosantes, que reagem com as aminas secundárias oriundas da dieta, formando as nitrosaminas, que são potentes carcinógenos e com ação teratogênica e mutagênica (MARTINS; MÍDIO, 2000).

Podem também ser consideradas doenças de origem hídrica aquelas causadas pela carência de alguns elementos na água: a ausência de iodo é responsável pelo bócio e conseqüentemente, pelo cretinismo. Da mesma forma, a falta de flúor produz crescimento debilitado de dentes e ossos. Mas, em concentrações de 2 a 4 mg.L⁻¹, o flúor causa manchas no esmalte dos dentes, rigidez e dores nas articulações e deformações do esqueleto. A concentração sugerida para águas potáveis é de 1 mg.L⁻¹ e até um máximo de 1,5 mg.L⁻¹.

Doenças de Veiculação Hídrica e relacionadas com a água

A passagem dos grupos humanos da forma nômade de vida para a sedentária levou à domesticação de animais e ao domínio da agricultura. Criaram-se então condições favoráveis para a circulação contínua de agentes infecciosos e se contribuiu para fechar o ciclo ambiente-animal-homem. Transformações sociais e econômicas e o rápido desenvolvimento científico e tecnológico dos últimos séculos provocaram mudanças profundas nos hábitos de vida e nas relações humanas e destas com o ambiente influenciando no perfil das doenças infecciosas (WALDMAM, 2001).

A constante e intensa intervenção do homem no ambiente alterou a qualidade do ar, das águas e do solo com descargas poluidoras que causaram mudanças profundas na distribuição dos diversos componentes da biota (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011). Entre eles, destacam-se vetores de doenças infecciosas que deixaram seus habitats naturais agredidos em

busca de ambientes apropriados para sua adaptação e consequente desenvolvimento e reprodução.

Fezes humanas e resíduos sólidos contaminados são os principais veículos transmissores de doenças infecciosas que se propagam pela água e as principais causas de morte em crianças menores de dois anos. A pobreza e a desnutrição, ainda endêmicas no século XXI, favorecem a transmissão dos microrganismos patogênicos. O panorama do saneamento básico evidencia o alto risco à saúde pública, causado pelas falhas dos sistemas de vigilância epidemiológica, o controle insuficiente da população de mosquitos transmissores de microrganismos patogênicos e a aproximação da fauna silvestre aos grupos humanos urbanos ou rurais, pelo desflorestamento e outros impactos (LARREINAGA; CORCHO, 2001; BRASIL, 2013).

As fezes humanas e dos animais de sangue quente contêm componentes inorgânicos e microrganismos comensais que formam parte da biota normal; se o indivíduo está infectado, conterá também microrganismos patogênicos. A Tabela 1 apresenta a composição química das fezes e da urina de humanos e a Tabela 2 apresenta a composição da microbiota normal das fezes.

Tabela 1 - Composição Química das Fezes e da Urina Humanas

Componente	Composição aproximada em % do peso seco	
	Fezes	Urina
Cálcio (CaO)	4,5	4,5 – 6,0
Carbono	44 – 55	11 – 17
Nitrogênio	5,0 – 7,0	15 – 19
Matéria orgânica	88 – 97	65 – 85
Fósforo (P ₂ O ₅)	3,0 – 5,4	2,5 – 5,0
Potássio (K ₂ O)	1,0 – 2,5	3,0 – 4,5

Fonte: Feachem et al. (1983).

Composição da Microbiota das Fezes Humanas

- As fezes de pessoas saudáveis contêm número elevado de bactérias comensais, não patogênicas, inclusive benéficas que formam a biota intestinal normal.
- Algumas destas bactérias da biota normal colaboram na digestão, na fermentação (lactobacilos), e produzem vitaminas (vitamina K, como os coliformes).

Em pessoas infectadas, há microrganismos patogênicos. Os esgotos municipais, que juntam esgotos domésticos de bairros populosos, terão alta diversidade de microrganismos patogênicos, em geral, uma mistura de vírus, bactérias, protozoários e helmintos.

Tabela 2 - Microbiota Normal de Fezes de Indivíduos Saudáveis

	Número de bactérias por grama de fezes			
	Enterobactérias	Enterococos	Lactobacilos	Clostrídios
Países com dieta rica em carboidratos	$10^7 - 10^9$	$10^6 - 10^8$	$10^6 - 10^9$	$10^5 - 10^9$
Países c/dieta balanceada Proteínas – Carboidratos	$10^7 - 10^8$	$10^5 - 10^8$	$10^6 - 10^8$	$10^5 - 10^7$

	Número de bactérias por grama de fezes		
	Bacteroides	Bifidobactérias	Eubactérias
Países com dieta rica em carboidratos	$10^7 - 10^{10}$	$10^8 - 10^{10}$	$10^8 - 10^{10}$
Países c/dieta balanceada Proteínas – Carboidratos	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{10}$

Fonte: Feachem et al. (1983).

As fezes contaminadas com microrganismos patogênicos e os esgotos domésticos que as transportam são veículos de transmissão desses microrganismos e se despejados no ambiente sem tratamento adequado favorecem sua disseminação. As doenças infecciosas podem ser provocadas por vírus, bactérias, protozoários e helmintos patogênicos. A seguir, nas Tabelas 3 e 4, apresentam-se as doenças infecciosas associadas às fezes e aos esgotos domésticos, causadas por agentes patogênicos.

Tabela 3- Doenças Causadas por Vírus Patogênicos Humanos em Fezes

Vírus	Reservatório	Doença
Enterovírus, Poliovírus	Homem	Poliomielite, Febres, Meningite;
Echovírus	Homem	Diarreia, Febres, Meningite, Doenças Respiratórias;
Coxsackie	Homem	Febre, Meningite, Doenças Respiratórias.
Novos vírus entéricos		
Adenovírus	Homem e animais	Doenças Respiratórias, Infecções de Olhos;
Reovírus	Homem e animais	Não têm definidas;
Vírus da Hepatite "A"	Homem	Hepatite infecciosa.
Vírus associados com gastroenterite		
Rotavírus	Provavelmente o homem	Diarreia e vômitos;
Calicivírus	-	Diarreia e vômitos;
Agente Norwalk	Provavelmente o homem	Diarreia e vômitos.

Fonte: Feachem et al. (1983).

Tabela 4 - Doenças Causadas por Bactérias. Bactérias Patogênicas Frequentes em Esgotos Municipais

Bactérias	Reservatórios	Doença
<i>E. coli</i> patogênica	Homem	Diarreia
Salmonela		
<i>S. typhi</i>	Homem	Febre tifoide
<i>S. paratyphi</i>	Homem	Febre paratifoide
Outras Salmonelas	Homem e animais	Intoxicação alimentar e diarreias
<i>Shigela spp</i>	Homem	Disenteria bacilar
<i>V. cholerae</i>	Homem	Cólera
Outros vibriões	Homem	Diarreias
<i>Campylobacter spp</i>	Homem e animais	Diarreias
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Homem e animais	Diarreias e septicemias
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	Ratos	Leptospirose

Fonte: Feachem et al. (1983).

Os protozoários mais frequentes em fezes e transmitidos pela água correspondem apenas a quatro espécies, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Doenças Causadas por Protozoários Frequentes em Fezes Humanas

Protozoários	Transmissão	Doença
<i>Giardia lamblia</i>	Homem-solo-água-homem	Giardiase
<i>Entamoeba histolytica</i>	Homem-solo-água-homem	Amebiase
<i>Balantidium coli</i>	Animais-solo-água-homem	Balantidiase
<i>Cryptosporidium parvum</i> e outros	Animais-solo-água- homem	Cryptosporidiase

Fonte: Feachem et al. (1983).

A Tabela 6 apresenta doenças causadas por helmintos frequentes em fezes humanas que passam uma parte de seu ciclo de vida na água e apresentam-se alguns exemplos:

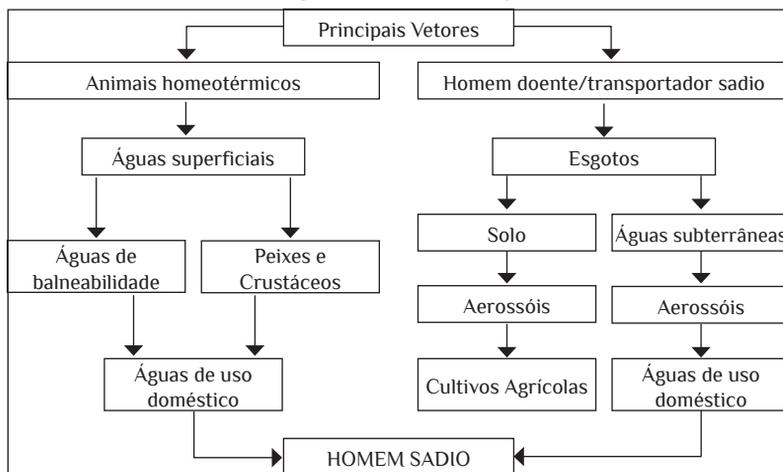
Tabela 6 - Doenças Causadas por Helmintos

Helminto	Transmissão	Doença
<i>Schistosoma mansoni</i>	Homem e animais-caramujo aquático-homem	Esquistossomose
<i>Schistosoma haematobium</i>	Homem-caramujo aquático-homem	Esquistossomose
<i>Schistosoma japonicum</i>	Homem-caramujo aquático-homem	Esquistossomose
<i>Fasciola hepática</i>	Ovelha-caramujo aquático-homem	Fasciolase
<i>Clonorchis sinensis</i>	Homem ou animal-caramujo aquático-peixe-homem	Clonorchiose

Fonte: Feachem et al. (1983).

A Figura 1 resume as principais vias de transmissão das doenças de veiculação hídrica.

Figura 1 - Principais vias de transmissão de microrganismos enteropatogênicos de veiculação hídrica



Fonte: Feachem et al. (1983).

A intensificação dos impactos ambientais criou uma nova realidade que acelerou o processo de disseminação dos microrganismos, modificou sua interação com o homem e criou condições para a emergência e difusão de novas doenças infecciosas, modificou o comportamento de doenças já conhecidas e ressurgiram algumas doenças consideradas erradicadas ou pelo menos controladas desde os inícios do século XX. Os anos 90 foram marcados pelo retorno de diversas doenças infecciosas ao redor do mundo, independente de seu nível de desenvolvimento (MORSE, 1995).

O conceito de doenças emergentes e reemergentes foi elaborado nos anos 90, década marcada por grandes epidemias e surtos das mesmas doenças de séculos atrás. As doenças emergentes e reemergentes foram definidas como doenças recentemente identificadas no homem ou já existentes que apresentam um aumento rápido de incidência, com ampla distribuição geográfica (SATCER, 1995).

Sua denominação “emergentes e reemergentes” expressou, de acordo com Waldman (2001, p.135), a “busca de novas abordagens de avaliação e de tentativas de identificar quais os instrumentos que permitiriam implementar novas estratégias para o controle dessas doenças, num mundo onde a introdução de novos fatores de risco e mudanças das características dos grupos expostos ocorrem com extrema rapidez”.

O CDC (1994) destacou dentre as doenças infecciosas emergentes e reemergentes a Síndrome Pulmonar por Hantavírus, a Febre Hemorrágica por Ebola, a Febre Viral Aguda de Lassa, a Doença de Lyme transmitida por carrapatos, a Cólera, a Coqueluche, a Dengue, e a Febre Amarela, estas duas últimas transmitidas por mosquitos de gênero *Aedes*, transmissores de Dengue (reemergente), Chicungunha e Zica (emergentes).

No Brasil, a Febre Amarela apresenta ciclos humanos urbanos e silvestres entre macacos, transmitida pelo *Aedes aegypti* selvagem (SILVA, 1998). A maior área endêmica do

planeta está na região amazônica, mas desde 1942 não existem registros da forma urbana. O Brasil passou 60 anos sem registrar casos de dengue. O *Aedes aegypti* foi combatido desde 1930, no Brasil, tendo êxito 20 anos depois. Reinfeções ocorreram em 1976 com ampla distribuição e 10 anos depois foi registrado pela primeira vez o *A. albopictus*, vetor secundário da Dengue em regiões do sudeste da Ásia e suscetível à infecção pelo vírus da febre amarela. Sua proliferação é um fator de risco para a reurbanização da febre amarela no Brasil. A Tabela 7 apresenta alguns dos fatores que contribuíram para a emergência e reemergência de doenças infecciosas, circunscritas em uma região limitada, que se disseminaram e atingiram zonas urbanas, infectando numerosas pessoas em caráter epidêmico e algumas se tornaram endêmicas.

Tabela 7 - Fatores Contribuintes de Doenças Infecciosas Emergentes ou Reemergentes

Fatores principais	Fatores específicos	Doenças
Mudanças ecológicas; desenvolvimento econômico e manipulação da terra	Agricultura; represas; desmatamentos; reflorestamentos; mudanças nos ecossistemas hídricos; enchentes; secas; fome e mudanças climáticas.	Esquistossomose; febres hemorrágicas; leishmaniose; disseminação das arboviroses (vírus Sabiá, vírus Rocio/encefalite, vírus Mayaro Puche/síndromes febris).
Demografia e comportamentos humanos	Crescimento populacional e migrações; guerras e conflitos civis; deterioração humana; adensamento populacional; comportamento sexual e uso de drogas venosas.	Síndrome de imunodeficiência adquirida; hepatites virais (B e C); dengue e tuberculose.
Comércio e viagens internacionais	Movimento internacional de pessoas e produtos; viagens aéreas.	Malária, disseminação de mosquitos vetores; cólera e dengue; influenza.
Indústria e tecnologia	Internacionalização do suprimento de alimentos; mudança no processamento e empacotamento de alimentos, transplante de órgãos e tecidos; drogas determinantes de imunossupressão; uso inadequado de antibióticos.	Encefalopatia espongiforme bovina; síndrome hemolítico-urêmica (<i>E. coli</i> O157: H7); hepatites B e C; doença de Chagas; infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos.

Fatores principais	Fatores específicos	Doenças
Adaptação e mudança dos agentes	Evolução dos microrganismos, pressão seletiva e desenvolvimento de resistência.	Variações naturais/mutações em vírus (HIV), bactérias (febre purpúrica brasileira causada pelo <i>H. influenzae</i>), resistência aos antimicrobianos, antivirais, antimaláricos e pesticidas, influenza.
Estrangulamento nas medidas de saúde pública	Saneamento e controle de vetores inadequados, cortes nos programas de prevenção.	Cólera, dengue e difteria.

Fonte: Morse (1995).

Doenças de Veiculação Hídrica e Relacionadas com a água

As doenças veiculadas pela água se caracterizam pelo microrganismo patogênico ser transportado pela água e o homem e os animais se infetam pela ingestão dessa água contaminada ou pelo contato com ela. Doenças relacionadas com água são aquelas associadas ao seu consumo e com insetos vetores que se reproduzem na água, se infetam e transferem o agente patogênico aos seres humanos ou aos animais. A água age como veículo direto na transmissão do agente infeccioso e também é local de criação de vetores biológicos e mecânicos.

Dentre as primeiras, citam-se com maior frequência a diarreia por *Samonella* sp e a cólera (*Vibrio cholerae*). Dentre as segundas, destacam-se a febre amarela, dengue, chicungunha e zica transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* e com sintomas semelhantes.

De acordo com o mecanismo pelo qual o microrganismo patogênico é transmitido desde uma pessoa doente para um novo hospedeiro sadio, as infecções veiculadas com a água e as relacionadas com a água podem ser classificadas em diferentes categorias. A classificação de Feachem et al. (1983) e Feachem (1984) considera quatro categorias de doenças

segundo sua associação com a água. Essa classificação é interessante por relacionar os agentes etiológicos e seus vetores com o ambiente e é utilizada até hoje pelo seu conteúdo e praticidade.

A distribuição das doenças infecciosas leva em consideração a associação do agente infeccioso com as condições ambientais, em particular como a qualidade e a quantidade de água que podem favorecer ou limitar sua disseminação.

- **Primeira Categoria - Mecanismo de transmissão de doenças que têm como origem a água.** Ocorre transmissão hídrica direta: o microrganismo patogênico está presente na água e é ingerido pelo novo hospedeiro (homem ou animal) o qual adquirirá a infecção. Nesta categoria, estão incluídas infecções causadas por:
 - › Bactérias: a cólera (*Vibrio cholerae*), a febre tifoide (*Salmonella typhi*), disenteria bacilar (*Shigella dysenteriae*).
 - › Vírus: hepatite infecciosa (hepatite A), Poliomielite (poliovírus) e rotavírus (diarreias).
 - › Protozoários: amebíase (*Entamoeba histolytica*), giardiase (*Giardia lamblia*), cryptosporidiase (*Cryptosporidium parvum*), entre outras.

Todos esses microrganismos patogênicos seguem a via oral-fecal, isto é, são eliminados com as fezes do indivíduo doente e penetram pela boca da pessoa suscetível que se tornará um novo hospedeiro, portanto, um novo doente (homem ou animal). A água é apenas uma via de transmissão.

Outras vias que permitem a transferência do material fecal para a boca são: mãos sujas, alimentos, utensílios e fômites e solo contaminado.

- **Segunda categoria - Mecanismos associados à água de lavagem e higiene pessoal.** Numerosas doenças intestinais, da pele e dos olhos estão relacionadas com a falta de água. As doenças associadas à água de lavagem são definidas como aquelas cuja transmissão pode ser reduzida aumentando-se o volume de água usada para higiene pessoal. São classificadas em três subgrupos:
 - › Infecções do aparelho digestivo, com diarreias responsáveis por morte de números elevados de crianças. Este subgrupo inclui as doenças mencionadas na primeira categoria, de transmissão oral-fecal. As melhorias das condições higiênicas da população com o suprimento abundante de água de boa qualidade tendem a causar a diminuição dessas doenças. Foi comprovado que a disenteria bacilar cai drasticamente com o lavado correto das mãos “Tua mão seja de manhã com água fresca lavada...” (LE LONG, 1636, p.35 apud VIGARELLO, 1996).
 - › Infecções da pele e dos olhos, tais como furúnculos por estafilococos, micoses superficiais, sarnas e tracoma. Esta última é uma doença inflamatória dos olhos, provocada pela bactéria *Chlamydia trachomatis*, sorotipos A, B, Ba e C; é crônica e recidivante, afeta a córnea e a conjuntiva, e pode levar à cegueira. É transmitida por algumas espécies de moscas e por contágio com materiais contaminados (lençóis, lenços, toalhas, etc.). Seguem a rota fecal-oral e estão relacionadas com a falta de higiene e com a falta de água, portanto, maior volume de água para a lavagem do corpo reduz acentuadamente o número de incidências.

- › Infecções causadas por piolhos, pulgas e percevejos. Os piolhos são vetores de rickettsias que causam vários tipos de tifo, dentre eles, a *Rickettsia prowazski*, agente do tifo epidêmico. São também vetores de espiroquetas, como a *Borrelia recurrentis* responsável pela febre recorrente. Estas infecções são causadas pela infestação das roupas e por artrópodes. Maior disponibilidade de água para lavagem de roupa e higiene pessoal tende a eliminar rapidamente estas doenças.

- **Terceira Categoria - Mecanismos baseados na água.** São doenças cujo agente etiológico passa parte do seu ciclo de vida na água, dentro de um hospedeiro intermediário como o caramujo. Todos estes patógenos são vermes parasitas (helmintos) que dependem do hospedeiro aquático para completar seu desenvolvimento. A grandeza da infecção depende do número de vermes adultos que estão infectando o paciente. Desta forma, a importância da doença pode ser medida como “a intensidade da infecção” de uma pessoa (que depende do número de vermes) e pelo número de pessoas infectadas numa população. As parasitoses são as únicas infecções que podem ser medidas ou categorizadas em infecções de baixa, média e alta intensidade.
 - › A esquistossomose é um bom exemplo da categoria três: a água poluída com excretas contém ovos de *Schistosoma mansoni* os quais eclodem liberando miracídeos que penetram na *Biomphalaria* onde evoluem até cercárias que reinfectam o homem, penetrando pela pele.

- › O verme guiné (*Dracunculus medinensis*). A larva sai do homem doente por uma ferida na pele da perna e penetra num pequeno crustáceo aquático (copépodes). O homem se reinfecta ao ingerir a água que contém o crustáceo. Outras doenças que pertencem a esta categoria são adquiridas pela ingestão de peixes, crustáceos ou vegetação aquática mal cozidos.
- **Quarta Categoria - Mecanismo que tem insetos como vetores.** São doenças transmitidas por insetos vetores que se criam na água ou se alimentam e picam perto da água. Os mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* são os mais comuns. *Aedes aegypti* e em menor escala *Aedes albopictus* são transmissores da malária, da dengue, da febre amarela, da chicungunha e da zica.
 - › A filariose é transmitida por mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*. A filariase, filariose ou elefantíase é uma doença parasitária infecciosa, causada pelos nematoides filariais da superfamília *Filarioidea*, também conhecida como *Filariae*. A forma sintomática mais conhecida é a filariase linfática ou elefantíase, nome devido ao inchaço e engrossamento da pele e tecidos subjacentes. Foi a primeira das enfermidades infecciosas transmitidas por insetos a ser descoberta. A variante linfática é causada pelos vermes *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*. As larvas são transmitidas pela picada dos mosquitos infectados. Da corrente sanguínea, essas larvas se dirigem aos vasos linfáticos, onde amadurecem para as formas adultas e sexuadas. Após oito meses da infecção inicial (período pré-patente),

começam a produzir microfilárias que surgem no sangue e em numerosos órgãos. O mosquito se infecta quando pica um ser humano doente. Dentro do mosquito, as microfilárias modificam-se ao fim de alguns dias nas formas infectantes, que migram principalmente para o aparelho bucal do mosquito. Quando o hospedeiro definitivo é picado, a larva sai do mosquito e entra na corrente sanguínea do homem (seu único hospedeiro definitivo).

- › A mosca Tsé-Tsé é um vetor que se alimenta e pica perto da água e é transmissora da doença do sono. É uma infecção frequentemente fatal causada pelo *Trypanosoma brucei*. Há duas formas de manifestação, uma na África Ocidental, incluindo Angola e Guiné-Bissau, causada pela subespécie *T. brucei gambiense*, com características crônicas e outra ocorre na África Oriental, incluindo Moçambique, causada pelo *T. bruceirhodesiense*. Os sintomas iniciais são recorrentes (febres, tremores, dores musculares e articulares, linfadenopatia, mal-estar, perda de peso, anemia e trombocitopenia). A infecção por *T. rodesiense* pode provocar danos cardíacos com insuficiência desse órgão na fase aguda. Os sintomas neurológicos e meningoencefalite e retardação mental aparecem mais tardiamente. Na infecção por *T. gambiense* ocorre invasão do cérebro geralmente após seis meses e o *T. rodesiense* pode invadi-lo após algumas semanas. Sintomas típicos são convulsões epiléticas, sonolência e apatia que concluem com o coma. A morte segue-se entre seis meses a seis anos após a infecção para o *T. gambiense*, e quase sempre antes de seis meses pelo *T. rodesiense*.

Classificação Ambiental das Doenças Veiculadas e Relacionadas com a Água

A diversidade e a quantidade dos microrganismos patogênicos que podem estar presentes nas fezes e nos esgotos municipais representam riscos possíveis (ou riscos virtuais) de contaminação dos seres humanos e dos animais. A possibilidade real de transmissão de esses microrganismos atingirem um novo hospedeiro, ou seja, o risco real de ocorrer contaminação humana depende de diversos fatores que incluem as características do microrganismo patogênico, as características do ambiente que será seu veículo de transmissão (água, solo - temperatura, pH, salinidade, presença de nutriente e de predadores), as necessidades ou não de um hospedeiro intermediário e as características do hospedeiro final (idade, estado nutricional, condições do sistema imunológico, grupo de risco, doenças de base).

Com base nesses critérios, e completando a descrição das quatro categorias das doenças relacionadas com a água e de veiculação hídrica, Feachem et al. (1983) ampliaram a classificação ambiental das enfermidades relacionadas com as fezes e os esgotos em seis categorias que avaliam a existência ou não de um período de latência do patógeno (período necessário para que o microrganismo após excretado se torne infetante – os vermes parasitos têm latência), a concentração da dose infecciosa (concentração de partículas infecciosas – bactérias, vírus, cistos, ovos – necessárias para causar a enfermidade), a persistência (tempo de sobrevivência no ambiente das formas infecciosas do patógeno), a existência de um hospedeiro intermediário e sua capacidade de sobrevivência e a forma de transmissão. Incluíram, ainda, algumas medidas importantes de controle (Tabela 8).

Tabela 8- Classificação Ambiental das Doenças Relacionadas com as Excretas

Categoria e aspectos epidemiológicos	Infecção	Formas principais de transmissão	Principal medida de controle
1. Sem latência ¹ DI baixa ²	Amebíase Enterobíase Enterovirus Giardiase Hepatite infecciosa Infecções por rotavírus	Pessoa a pessoa Doméstica	Redes de distribuição de água potável Educação sanitária Construção de banheiros nas próprias casas
2. Sem latência: DI média: persistência ³ moderada com multiplicação no ambiente	Campilobacteriose Cólera Infecções por <i>E. coli</i> enteropatógenia Salmonelose Shigelose Febre tifoide	Falta de higiene individual Falta de higiene doméstica Águas contaminadas Culturas contaminadas	Redes de distribuição de água potável Educação sanitária Construção de banheiros nas próprias casas Tratamento do material fecal antes de ser descartado no ambiente
3. Com latência e persistência, sem hospedeiros intermediários	Ascariídiase Ancilostomíase Estrongiloidíase Tricuriíase	Campos e culturas contaminados	Construção de banheiros nas próprias casas Tratamento do material fecal antes de ser descartado no ambiente
4. Com latência, persistência e hospedeiros intermediários: vacas e porcos	Teniase	Campos e forragens contaminados	Construção de banheiros nas próprias casas Tratamento do material fecal antes de ser descartado no ambiente Bom cozimento da carne antes do seu consumo

5. Com latência, persistência e hospedeiro intermediário aquático	Esquistosomíase Fasciolose	Água	Construção de banheiros nas próprias casas Tratamento do material fecal antes de ser descartado no ambiente Controle do reservatório animal Controle dos hospedeiros intermediários Bom cozimento dos peixes e frutos do mar em geral
---	-------------------------------	------	---

6. Disseminação por insetos relacionados com águas poluídas com excretas ou não	Flariase bancroftiana (transmitida pelo mosquito <i>Culex pipiens</i>) Mosquitos <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> com material fecal (Dengue, Chikungunya e Zica) Infecções categorias 1 a 5 ou transmitidas por vetores mecânicos (baratas, moscas)	Locais contaminados Águas contaminadas: ovos do mosquito	Identificação e eliminação dos insetos transmissores
---	--	---	--

Fonte: Feachem et al. (1983).

Notas:

- 1 Latência: período que deve transcorrer para que o microorganismo, após excretado, torne-se infectivo.
- 2 Dose infecciosa: concentração de partículas infecciosas necessárias para causar a enfermidade (DI baixa: 100 partículas ou menos; DI média: 10^3 a 10^4 ; DI alta: 10^5 a 10^6).
- 3 Persistência: tempo de sobrevivência no meio ambiente das formas infectivas.

Observa-se que o controle da maioria dessas doenças se relaciona com o destino final das excretas (construção de banheiros) e o tratamento dos esgotos. Ambas as medidas são dirigidas à redução da disseminação a céu aberto dos microrganismos patogênicos. São medidas básicas e essenciais que constituem barreiras sanitárias que diminuem significativamente a circulação ambiental dos patógenos e, portanto, diminuem os riscos às infecções de humanos e animais. Em consequência, diminuem as vias de contaminação das águas superficiais e do solo. Essas medidas junto ao aumento de distribuição de água potável promovem a saúde humana e ambiental.

A transmissão dos microrganismos patogênicos veiculados pela água e pelos esgotos precisa de condições ambientais que favoreçam seu livre trânsito até o novo hospedeiro sadio. Ambientes mal saneados com esgotos circulando a céu aberto, assim como população defecando no campo pela falta de uma simples fossa rudimentar, carência de água de boa qualidade para beber e para higiene pessoal favorecem a transmissão hídrica e ambiental das doenças infecciosas.

Em geral, associam-se grandes volumes de água natural com ambientes mais limpos e populações mais saudias. O Brasil detém mais de 10% da água doce do mundo em condições potenciais de serem potabilizadas (TUNDISI, 2003), já sua distribuição por região geográfica é heterogênea e causa limitante do desenvolvimento social e econômico em algumas. A distribuição espacial dos recursos hídricos brasileiros não coincide com as demandas da população: a região Norte, com apenas 7% da população brasileira, reúne 68% da água doce do país na bacia amazônica, o Nordeste, com 29% da população, tem apenas 3% da água doce, já o Sudeste, com 43% dos habitantes do país, possui menos de 6% da água doce de superfície (SANASA, 2016).

O diagnóstico do “Ranking do Saneamento 2014” (TRATA BRASIL, 2013) considera os principais indicadores de saneamento básico dos 100 maiores municípios do Brasil: abastecimento de água; coleta e tratamento de esgotos; perdas; entre outros, com base no Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) de 2012, do Ministério das Cidades. Os dados mostram que em todo o Brasil:

- 82,5% da população dispõem de água tratada, e a média do consumo no país é de 166,3 litros por pessoa.dia⁻¹;
- 37% da água tratada se perdem na distribuição;
- 48,6% dos municípios têm acesso à coleta de esgotos;
- 39 % do esgoto coletado recebem algum tipo de tratamento;

No Nordeste, a média de consumo de água potável é de 125,8 litros.pessoa.dia⁻¹; e do Sudeste é de 194,1litros.pessoa.dia⁻¹.

A ONU recomenda uma média de 110 litros de água por pessoa por dia, ou seja, Pernambuco e Alagoas fogem da média, ficando abaixo do recomendado. Verifica-se, na tabela anterior, que os maiores consumos de água encanada se concentram nas grandes cidades (Rio de Janeiro e São Paulo), com baixas perdas na distribuição e baixa porcentagem de tratamento de esgotos (na ordem de 32 a 34%), e Amapá com altos valores de consumo de água apresenta escassas redes de distribuição, altas perdas na distribuição e deficiente coleta de esgotos. Muita água disponível numa região não significa necessariamente água potabilizada e distribuída, esgoto coletado e tratado, e condições dignas de vida. A Amazônia Legal é um exemplo, onde o “excesso” de água é até uma barreira para o avanço do saneamento básico concebido nos padrões

tradicionais. Neste, o tratamento da água e dos esgotos é feito em grandes estações de tratamento que produzem grandes quantidades de efluentes, e no caso da água, são distribuídos por longas redes. Deve-se pensar seriamente em outro modelo para esta região (e para outras também, respeitando suas diferenças), onde os caminhos mais importantes que ligam as ilhas com seus habitantes são exatamente os caminhos das águas.

Considerem-se, nesse contexto, os dados de saneamento básico para a Amazônia Legal.

Na Amazônia Legal:

- 60% dos municípios têm rede de distribuição de água tratada;
- 24% dos domicílios usam água de poços e nascentes;
- 13,2% dos domicílios de lagos, açude ou poços;
- 14,6% dos municípios têm rede coletora de esgotos;
- 49,2% dos municípios possuem fossas rudimentares para descartes dos dejetos fecais.

No Acre e em outros Estados do Norte brasileiro, a associação entre deficiências de saneamento básico e doenças veiculadas pela água é facilmente visualizada.

Acre

- 42,61 dos municípios têm rede de distribuição de água;
- 42,61% da água tratada se perdem na distribuição.
- A média de consumo de água no país é de:
- 10,4 % dos municípios possuem rede coletora de esgotos;
- 17,6% dos esgotos coletados são tratados;
- 49,2% dos municípios possuem fossas rudimentares para descartes dos dejetos fecais.

Das doenças predominantes no Acre:

- 69 casos de hepatite por 100 mil habitantes;
- 32 casos de amebíase por mil habitantes;
- 4,62 casos de leptospirose por mil habitantes;
- 2,7 casos por mil habitantes.

O projeto “Brasil das Águas: revelando ao azul do verde amarelo” tem entre seus membros o Dr. José Galizia Tundisi, atual presidente do Instituto Internacional de Ecologia com sede em São Carlos, SP. Ele e seus colegas estudaram a composição iônica e a concentração de carbono, nitrogênio e fósforo na água de numerosos rios e reservatórios brasileiros e, utilizando a concentração de fósforo total, classificaram as amostras em um Índice de Estado Trófico (IET). Com base nesses resultados, acrescidos dos dados de abundância e diversidade do fitoplâncton, zooplâncton, e bacterioplâncton, presença de metais pesados e agrotóxicos nas águas e nos sedimentos, relataram que a situação das águas dos brasileiros é preocupante pelos altos níveis de degradação observados, principalmente, nas regiões de maior concentração populacional do país, com maior PIB (regiões Sudeste e Sul). Destacaram que as águas doces são recurso estratégico para o país, por promoverem o desenvolvimento social e econômico, possibilitando melhor qualidade de vida, diminuição da mortalidade infantil e melhor distribuição de renda. Porém, quando contaminadas têm efeito contrário: diminuem a qualidade de vida, aumentam a mortalidade infantil, e põem em risco a segurança coletiva da população, produzindo resultados econômicos adversos. Os resultados do monitoramento revelaram a importância do controle sistemático das águas, e a urgência de ações governamentais de proteção e de aplicação de tecnologias de recuperação. Entre elas,

citam-se o tratamento de maior volume dos esgotos produzidos e melhor qualidade dos efluentes lançados ao ambiente, aterros sanitários, tratamento apropriado dos efluentes industriais, reflorestamento, preservação das nascentes e das áreas alagadas; saneamento básico das áreas periurbanas das metrópoles, entre outros (TUNDISI, 2015).

A saúde humana e níveis adequados de vida que geram o bem-estar estão intimamente ligados à qualidade ambiental. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 24% dos anos de vida perdidos por incapacidade e 23% das mortes prematuras em todo o mundo são devido à exposição a riscos ambientais e ocupacionais que podem ser evitados. Nas Américas, a carga de doenças atribuíveis a fatores ambientais evitáveis é estimada em 17,2%. É importante um olhar integrado sobre questões de saúde, conhecer e entender as inter-relações entre a carga de doenças e o acesso aos padrões de uso dos recursos, às pressões ambientais diversas incluídas as mudanças climáticas globais. A proteção da saúde pública é obrigação do Estado e, para isso, devem-se construir estratégias de saúde ambiental que incluam os conceitos de desenvolvimento sustentável, o fortalecimento da política de cobertura universal de saúde, a garantia da segurança humana, trabalhar com uma visão global e com enfoque local e o compromisso explícito com a redução de iniquidades em saúde, o qual envolve, em primeiro plano, o saneamento básico (BRASIL, 2013).

A vigilância ambiental, através do monitoramento sistemático da qualidade dos efluentes produzidos, da água tratada distribuída, das fontes de água usadas para potabilização, para irrigação e aquicultura e para recreação, entre outras fontes, é parte integrante fundamental de todo e qualquer programa e estratégia de saúde ambiental e humana por prover dados básicos para a gestão.

Referências

BAKER, M. N.; TARAS, M. J. **The quest for pure water: the history of the twentieth century.** 2. ed. Denver: AWWA, 1981. Volume I.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à Engenharia Sanitária.** 3. ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986. 616 p.

BRANCO, S. M. **Água: origem, uso e preservação.** 2. ed. São Paulo: Moderna, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 14 de setembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água.** 4. ed. Brasília: FUNASA, 2013. 150p.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Addressing Emerging Infectious Disease Threats.** A Prevention Strategies for the United States. 1994. Disponível em: <www.cdc.gov/mmwr/preview/mmhtml/0003/93>. Acesso em: 20 de setembro de 2015.

CEBALLOS, B. S. O. ; DANIEL, L. A.; BASTOS, R. X. K. Tratamento de água para consumo humano. Panorama mundial e ações do PROSAB-Edital 5 - Tema 1. In: Valter Lucio de Pádua. (Org.). **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento da água.** 1. ed. Rio de Janeiro: Zeppelini, 2009, v. 01, p.19-43.

FEACHEM, R. G. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of personal and domestic hygiene. **Bull World Health Organ**, n. 62, p.467-76, 1984.

FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELIK, H.; MARA, D. D. **Santination an Disease: health aspects of excreta and waste water management.** John Wiley and Sons, Chichester, 1983, 501p.

GRASSI, M. T. **As águas do planeta Terra**. São Paulo: Química Nova na Escola, 2001. (Edição especial).

LARREINAGA, C. L. S.; CORCHO, D. B. Enfermedades emergentes y reemergentes: factores causales y vigilancia. **Rev Cubana Med Gen Integr**, Havana, v.16, n.6, nov/dez. 2001. Versão online ISSN 1561-3038.

MARTINS, D. L.; MÍDIO, A. F. **Toxicologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2000.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerg Infect Dis.**, v. 1, p.715, 1995.

REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 3. ed. São Paulo: Escrituras, 2006, 748 p.

SANASA. SITUAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS NO BRASIL (2016). Disponível em: <http://www.sanasa.com.br/noticias/not_con3.asp?par_nrod=587&flag=PC>. Acesso em: 12 dez. 2016.

SATCHER, D. Emerging Infectious: getting ahead of the curve. **Emerg. Infec. Dis.**, v.1, n.1, p.1-6, 1995.

SILVA, L. J. Emerging infectious diseases in Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.4, n. 2, p.341-3, abr-jun, 1998.

SNOW, J. **Sobre a Maneira de Transmissão do Cólera**. 2. ed. São Paulo: Hucitec-Abrasco, 1990, 249p.

TRATA BRASIL. **Ranking do Saneamento**. 2013. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento>>. Acesso em: 02 jul. 2015.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: RIMA, 2003, 248p.

_____. O Futuro dos Recursos Hídricos do Brasil. **Revista Bio/ABES**, p.60-61, jul/set. 2015, (Extraído de Projeto Brasil das Águas: Revelando o Azul do Verde Amarelo). Disponível em: < <http://brasildasaguas.com.br/>>. Acesso em: 14 out. 2015.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI. **Recursos Hídricos no Século XXI: oficina de textos**, 2011, 328 p.

VIGARELLO, G. **O limpo e o sujo, uma história da higiene corporal**. Mônica Stahel (Trad.) São Paulo: Martins Fontes, 1996, 297p.

VOLLENWEIDER, R. A. **Scientific Fundamental of the Eutrophication of Lakes and Flowing Waters, with Particular Refrence to Nitrogen and Phosphorus as Factors in Eutrophication**. Paris: OECD (DAS/CSO.68.27), 1965.

WALDMAM, E. A. Doenças infecciosas emergentes e reemergentes. **Revista USP**, São Paulo, n.51, p.128-137, set./nov. 2001.

CAPÍTULO 2

Indicadores Microbiológicos de Poluição

Conceitos gerais

As características biológicas de uma água ou de um ambiente em geral englobam os diversos seres vivos que ali habitam. Estão incluídos macrorganismos (plantas, animais, grandes algas, por exemplo) e os microrganismos reunidos em pelo menos sete grandes grupos: bactérias, vírus, protozoários, helmintos, microalgas e cianobactérias e fungos.

São relevantes para o equilíbrio ou homeostase ambiental por serem os principais agentes das transformações de reciclagem dos elementos químicos essenciais para a vida através dos ciclos biogeoquímicos. Nesses ciclos, os microrganismos transformam a matéria orgânica em inorgânica (estabilizam-na), recuperam a energia contida nessas moléculas e disponibilizam para o ambiente nitrogênio, fósforo e enxofre, entre muitos outros elementos existentes e na forma de sais (nitratos, fosfatos, sulfatos, etc.). Simultaneamente, sintetizam nova biomassa.

Alguns microrganismos são virulentos, com capacidade de causar doenças e devem ser detectados e medidas de saneamento básico deverão ser implementadas para funcionarem como barreiras sanitárias que dificultem e até consigam evitar sua disseminação.

As comunidades biológicas expressam a integridade ecológica do ecossistema ao integrar os diferentes impactos naturais e antropogênicos ao ambiente e fornecer informações agregadas de seus efeitos.

Um indicador microbiológico de poluição orgânica ou indicador da qualidade sanitária de uma água ou de outra matriz ambiental é qualquer microrganismo ou grupo de microrganismos que pela sua presença (ou pela sua ausência), sua frequência de isolamento e pela diversidade dos gêneros e/ou espécies que compõem o grupo, demonstra(m) a existência de poluição e ou da contaminação fecal.

Desta forma, vírus, bactérias, protozoários, algas, cianobactérias e fungos, entre outros microrganismos, podem ser utilizados como indicadores das condições físicas, químicas e microbiológicas desse ambiente. As condições sanitárias de uma água ou de um ambiente em geral se referem, especificamente, à avaliação da presença dos microrganismos patogênicos e/ou de seus indicadores veiculados ou relacionados com a água e que constituem riscos à saúde do homem e dos animais.

De forma geral, são denominados bioindicadores aqueles organismos e comunidades que respondem à poluição ambiental com alterações metabólicas, morfológicas, comportamentais, aumento ou decréscimo populacional e, em consequência, com alterações na diversidade e na quantidade de organismos na comunidade. Dessa forma, fornecem informações das condições ambientais e das situações de mudanças.

Sistemas de monitoramento qualitativos e quantitativos da água incluem a avaliação de variáveis microbiológicas e sanitárias (bactérias coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e enterococos, entre outros) e se constituem em ferramentas fundamentais para as políticas públicas

e as ações de gestão. São exemplos a classificação dos corpos de água em classes de acordo com a qualidade de suas águas e a definição de seus usos e dos tipos de tratamentos a serem aplicados nessas águas para sua potabilização. Citam-se a Resolução CONAMA Nº 357/2005 (BRASIL, 2005), que “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e fornece diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”, a Resolução CONAMA Nº 274/2000 (BRASIL, 2000) que “Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras” e a Portaria Nº 2914/2011 (BRASIL, 2011) do Ministério da Saúde que “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”.

A poluição por matéria orgânica proveniente das descargas das bacias hidrográficas mal saneadas, de excretas de animais homeotermos e de esgotos domésticos não tratados ou mal tratados são as principais causas da poluição orgânica que causa mudanças profundas no corpo aquático receptor e que se manifesta na eutrofização das águas e nas consequentes transformações (BRANCO, 1986).

Essas águas passam a apresentar alta taxa de crescimento de organismos autótrofos fotossintetizadores, em geral, com predomínio de cianobactérias com capacidade de produzir potentes cianotoxinas que podem causar desde leve dermatite até tumores, cânceres e morte, entre outras consequências que impedem seu uso para os fins a que foram destinadas (ESTEVES, 2011).

Essas mudanças e os microrganismos que predominam em cada etapa são bem descritos nos estudos de autodepuração. As primeiras alterações da qualidade da água e as primeiras consequências ocorrem na zona de descarga dos esgotos ou de entrada das cargas poluidoras e são o aumento

da matéria orgânica e sua biodegradação que provocam forte depleção de oxigênio, morte de peixes e de outros organismos aquáticos. A concentração da matéria orgânica biodegradável (a ser degradada por bactérias e fungos, principalmente) é medida como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_{5,20}). Junto com o decréscimo do oxigênio dissolvido, ocorre aumento da turbidez da água. O crescimento excessivo de bactérias aeróbias, que são os principais agentes da degradação das proteínas, carboidratos e lipídeos presentes nas descargas, libera íons nitrogenados (nitrato) e fosfatados (ortofosfato) entre outros. O consumo de oxigênio gera condições anaeróbias e microrganismos fermentativos e anóxicos crescem rapidamente e substituem os aeróbios, produzindo gases de odores desagradáveis pela redução dos sulfatos até H₂S, e dos nitratos em nitrito e até amônia, produção de metano e mercaptanas.

Bactérias filamentosas dos gêneros *Thiothrix*, *Beggiatoa* e *Sphaerotillus* são abundantes nas regiões de rios e represas onde são descarregados os esgotos domésticos, assim como em pântanos, onde há abundante matéria orgânica em decomposição. Essas bactérias junto com leveduras e fungos do gênero *Geotrichum spp*, por exemplo, e com cianobactérias filamentosas dos gêneros *Oscillatoria* e *Phormidium*, entre outros, formam os denominados fungos dos esgotos (MARA, 1974). Estes se visualizam como tufo de fios esbranquiçados sobre um fundo aquático marrom-preto com filamentos verde-escuros. Portanto, a presença dessas bactérias e desses fungos em quantidades excessivas, no ambiente, são indicadores da entrada dos esgotos e de qualquer outro tipo de resíduo rico em matéria orgânica (MARA, 1974; BITTON, 2005).

O fluxo hidráulico transporta a água da zona de descarga para dentro do lago ou do açude ou ao longo do rio, ocorrendo sedimentação e diluição das partículas e moléculas orgânicas.

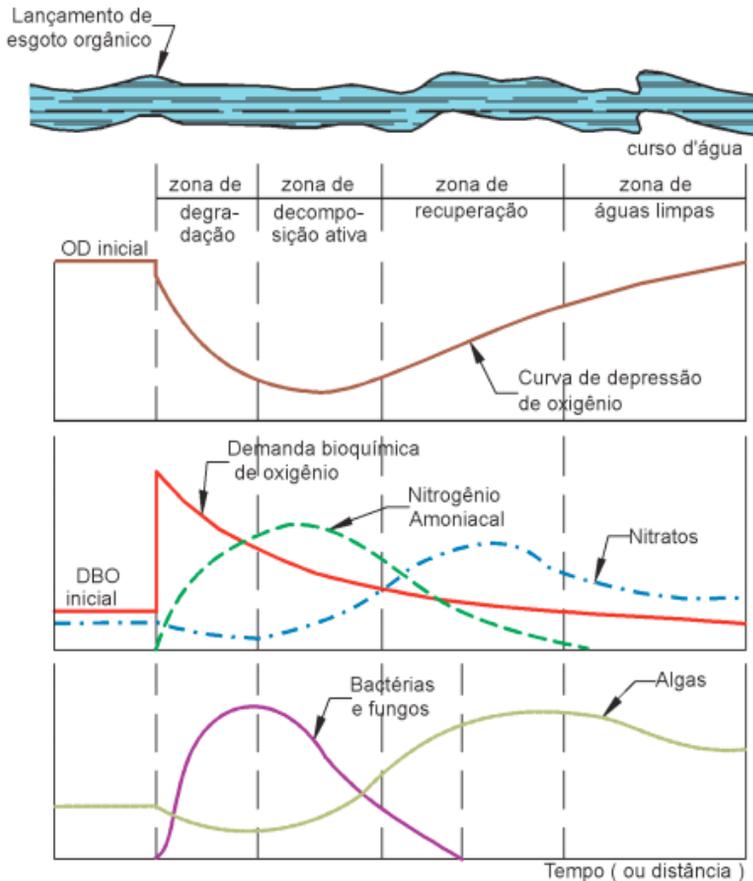
Com o decréscimo da concentração da matéria orgânica (diminuição da $DBO_{5,20}$), diminuem as bactérias filamentosas, as leveduras e os geofungos e começam a ser visualizados fungos aquáticos verdadeiros. Pelo efeito da sedimentação, a água recupera lentamente a transparência. A luz que penetra na coluna de água estimula a proliferação dos organismos fotossintéticos oxigênicos, aparecem assim maiores números de cianobactérias e algas, com predominância de flageladas verdes, como *Chlamydomonas spp* e *Euglena spp*, de metabolismo mixotrófico (seu metabolismo inclui simultaneamente a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos externos). O ambiente já não é hipereutrófico, não é dominado pelos fungos dos esgotos, mas é eutrófico.

Algas e cianobactérias estão presentes em números elevados e distribuídas em poucos gêneros nos ambientes eutróficos. Estes possuem altas densidades de cianobactérias e gêneros ou assembleias de gêneros e de espécies específicos que indicam o nível de poluição e as condições ambientais predominantes, expressam também as condições de turbulência da água.

Em águas oligotróficas e mesotróficas são abundantes as bactérias de vida livre com formas de bastonetes, cocos e espirilos em concentrações mais baixas que nos ambientes com alta poluição. São ricas em diversidade, mas com densidades populacionais menores em ambientes mesotróficos e mais diversos e menos abundantes nos ambientes oligotróficos. A maior diversidade de algas se manifesta no grupo das diatomáceas e das clorofíceas sendo frequentes os gêneros *Staurastrum*, *Cosmarium* e *Spirogira*, entre outros.

A Figura 1 mostra os efeitos das descargas de matéria orgânica em um corpo aquático, representados pelas curvas das concentrações de oxigênio dissolvido (OD), DBO, nitrogênio amoniacal e nitratos.

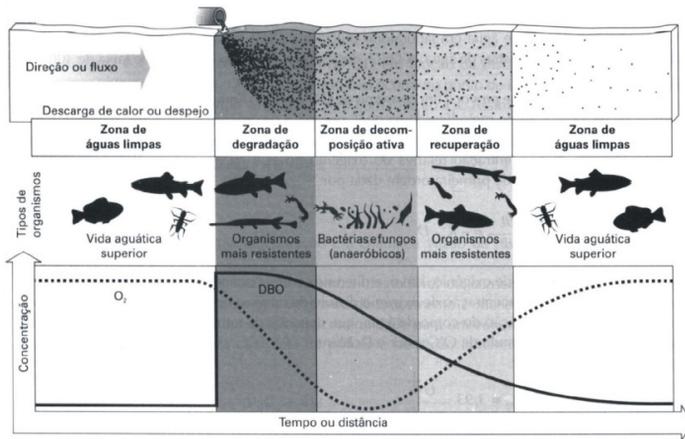
Figura 1- Curvas de autodepuração de um rio após descarga de esgotos domésticos



Fonte: Mota (1995).

A Figura 2 apresenta microrganismos indicadores de diferentes zonas do processo e mostra as variações bióticas ao longo da curva de autodepuração em um corpo aquático.

Figura 2- Processo de autodepuração e modificações da biota



Fonte: Braga et al. (2005).

Os desenhos da Figura 2 são apenas ilustrativos. Os peixes da zona de águas limpas (vida aquática superior) representam a biota de um ambiente oxigenado com baixa concentração de matéria orgânica. Nessa zona, o ecossistema biótico está formado por peixes, bactérias, cianobactérias, algas, protozoários e fungos sem predominância de grupos ou gêneros. Na zona de degradação, reduz-se a diversidade junto com o oxigênio e, na seguinte, tornam-se predominantes os organismos anaeróbicos com destaque para as bactérias e alguns fungos. Algas e cianobactérias retornam na zona seguinte, de águas limpas 2, estimuladas pela luz e as altas concentrações de nutrientes liberados nos processos de biodegradação em todas as etapas anteriores. O ambiente está recuperado em relação às concentrações de oxigênio dissolvido e de DBO, mas a biota autotrófica (algas, cianobactérias e macrófitas) é mais abundante que na zona de águas limpas 1, evidenciando o enriquecimento com nutrientes, ou seja, a água ficou com níveis mais altos de eutrofização.

Em geral, o zooplâncton é um importante indicador da poluição das águas e, dentre seus componentes, os protozoários são bons indicadores de poluição orgânica (ESTEVEZ, 2011).

Estudos do impacto da piscicultura intensiva em tanques-rede sobre a qualidade da água de um açude no semiárido nordestino, utilizando a comunidade zooplanctônica como bioindicadora dos efeitos causados pelo incremento de nutrientes decorridos dessa atividade, mostraram que eventos de chuvas além da piscicultura contribuíram para o aumento do nível de trofia, confirmada pelo IET de Carlson modificado, classificando-o como eutrófico. Os metazoários do filo rotífero mostram-se mais representativos em riqueza, abundância e densidade seguidos dos microcrustáceos copepoda e cladocera. A densidade apresenta-se significativamente maior na época seca para todas as espécies zooplanctônicas, com maior abundância de *Brachionus sp*, *Filinia sp*, *Keratella americana*, *Ceriodaphnia cornuta*, náuplios de copépodes, copepoditos calanoides e cyclopóides, associadas a ecossistemas eutrofizados. Portanto, comunidades zooplanctônicas são bioindicadores adequados da qualidade de águas, particularmente em processo de eutrofização (CAVALCANTI et al., 2012). Rotíferos também se mostraram indicadores apropriados das etapas de depuração de água residuária ao longo dos canais de um sistema de terras úmidas (*wetlands*). O efluente mostrou boa eficiência de remoção de poluentes (a água passou de polisapróbica na entrada para alfa mesosapróbica na saída). E pode também ter importante papel na redução de bactérias patogênicas (PARESCHI, 2004).

Os protozoários são essenciais nos processos de depuração biológica aeróbia das águas residuais e bastante utilizados como indicadores nos sistemas de lodos ativados. Sua alimentação é heterogênea o que os torna excelentes degradadores: são bacteriófagos, detritívoros, herbívoros, carnívoros e até canibais.

O sistema de lodos ativados é bastante utilizado no tratamento biológico aeróbio de esgoto sanitário e industrial.

Baseia-se na oxidação bioquímica dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos esgotos, que é realizada por populações de microrganismos bem diversificados que são mantidas em suspensão no meio líquido por agitação com injeção de ar o qual gera um ambiente aeróbio rico em oxigênio dissolvido (SEVIOUR; BLACKALL, 1999). A comunidade que se estabelece nesse sistema é dinâmica e a base do tratamento, com cada espécie cumprindo um papel metabólico diferenciado, mas integrado ao todo o processo e de alta importância para o bom funcionamento do sistema. A estrutura e o funcionamento dessa comunidade estão diretamente relacionados com as condições operacionais e com a qualidade e quantidade do esgoto afluente que alimenta o reator (VAZOLLÉR et al., 1989). Devido a essa íntima associação, a avaliação microbiológica do lodo fornece informações suficientes e precisas sobre o desempenho do sistema e, em consequência, da qualidade do efluente.

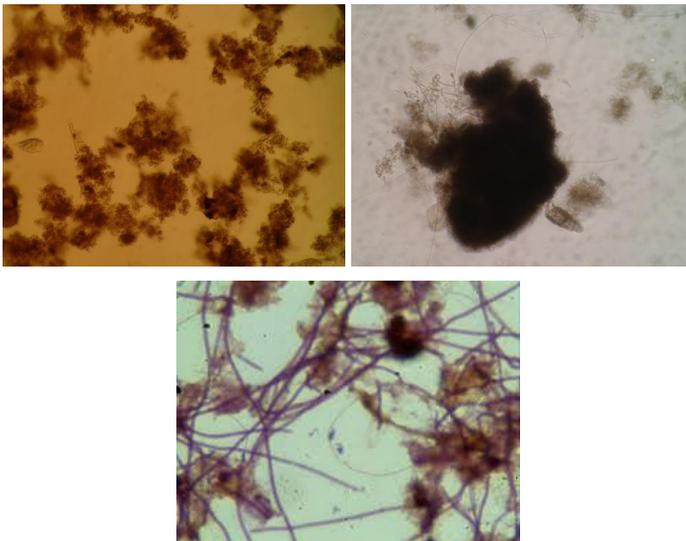
A eficiência do tratamento depende da formação de flocos biológicos adequados no tanque de aeração. Na formação desses flocos, intervêm bactérias filamentosas e mucilaginosas formadoras de flocos. Os flocos biológicos deverão ter dimensões apropriadas para sedimentarem rapidamente no tanque de sedimentação secundário. Flocos ideais para atingir a boa eficiência na biodegradação da matéria orgânica e posterior sedimentação devem ser predominantemente de tamanho entre médio e grande: em torno de 500 µm a 1000 µm e devem ser compactos e redondos. Flocos pequenos (75 µm), redondos e compactos, denominados como flocos “Pin-point” por serem leves não terão boa sedimentação. Os flocos com excesso de bactérias filamentosas também não sedimentarão, ficarão flutuando no tanque de decantação causando o intumescimento do lodo ou *bulking*.

Em relação à biota nos reatores de lodos ativados, no início de funcionamento quando a carga orgânica é elevada, observa-se a predominância de protozoários ameboides

(sarcodina) e flagelados no tanque de aeração. À medida que aumenta a idade do lodo, passam a predominar protozoários ciliados de vida livre (exemplo: *Paramecium* spp) que se alimentam ativamente de bactérias e posteriormente protozoários ciliados fixos (exemplo: *Vorticella*spp) que têm ampla capacidade de ingerir diversos outros microrganismos.

A simples observação microscópica dos flocos formados no lodo do tanque de aeração permite ter uma ideia do funcionamento do sistema: flocos de tamanho médio, semi-compactos, com abundantes protozoários ciliados fixos e bactérias filamentosas formando parte de seu esqueleto, evidenciam bom funcionamento, particularmente se o líquido é claro com poucas bactérias e abundantes ciliados de vida livre nadando entre os flocos. Na figura 3 apresenta-se flocos biológicos de lodos ativados.

Figura 3 - Flocos biológicos pequenos bem formados (a), floco biológico ideal com um ciliado livre aderido (b), flocos filamentosos (c).

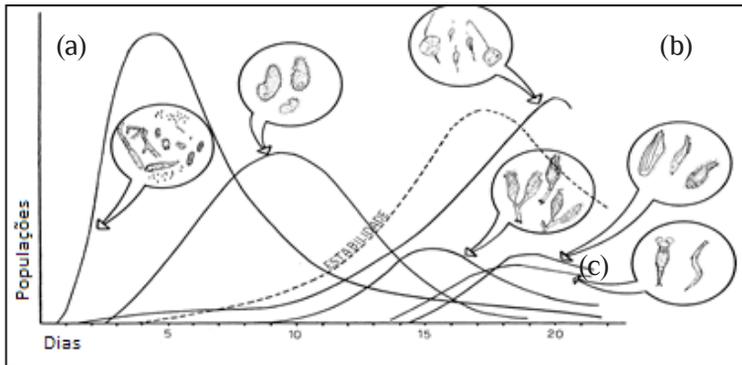


Fonte: Piedade (2015).

São esses protozoários e os outros componentes do zooplâncton que determinam o sucesso do tratamento.

A Figura 9 mostra a sucessão de protozoários, microcrustáceos, metazoários e cladóceros no tanque de aeração do sistema de lodos ativados com o aumento da idade do lodo.

Figura 4 - Representação esquemática das curvas de populações de microrganismos em relação ao tempo de aeração e à estabilização da matéria orgânica em lodos ativados



Fonte: Branco (1969).

Observações de Branco (1969) mostraram a sucessão representada na Figura 4:

Primeira etapa: presença de flagelados que atingem seu maior número (cerca de 500 organismos por mL) em torno do 7º dia de aeração, elevando-se até o 15º dia. Logo surge uma rica população de flagelados pequenos do gênero *Bodo*, que pode atingir 50.000 organismos.mL⁻¹ ao redor do 22º dia;

Segunda etapa: presença de abundantes Ciliados, o ambiente é rico em bactérias, e o pH se eleva. Ocorre intensa proliferação dos ciliados de locomoção muito rápida, (gênero *Colpoda*), com máxima população no 11º dia de aeração. Ocorre a partir do 4º ou 5º dia a transformação de alguns

ciliados em cistos que se aderem aos flocos e o número de bactérias em suspensão que são seu principal alimento diminui. Logo após o 10^o dia, o número de ciliados ativos ultrapassa 40.000/mL e o número de cistos é superior às formas ativas, a curva de crescimento declina rapidamente. Aparecem ciliados sésseis peritricos com pedúnculos que se prendem à superfície dos flocos, e atingem até 1.500 indivíduos.dia⁻¹/mL, no 15^o, passam a declinar. Predominam os peritricos *Opercularia*, *Epistylis*, *Pyxidium*. Finalmente declinam estes e se deformam os flocos com presença de alguns de ciliados livre-nadantes, dos gêneros *Liotus*, *Amphileptus* e *Loxodes*;

Na terceira e última etapa: aparecem os microinvertebrados, nematoides de vida livre entre o 13^o-14^o dia.

Conclui-se que os melhores indicadores do tratamento, ou seja, do processo de biodegradação da matéria orgânica, nesses sistemas, são os microrganismos envolvidos, semelhantes ao processo de autodepuração. Protozoários podem ser também importantes indicadores de elementos tóxicos na água tais como cobre, zinco, Triton X-100 (NICOLAU et al., 1999).

Referências

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. Ed. Wiley and Sons, 2005. 789 p. Blog Biossegurança. 2011. Disponível em: <<http://www.cristofoli.com/biosseguranca/wp-content/uploads/2011/04/materia-2604-caixas-estojos-e-cassetes.jpeg>>. Acesso em: 13 de outubro de 2015.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005, 313p.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada a la ingenieria sanitária**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1969, 361p.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à Engenharia Sanitária**. 3. ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986, 616 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2000.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de 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**, Brasília, n.53, p.58-63, 18 mar. 2005.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 14 de setembro de 2015.

CAVALCANTI, A. J. M.; DINIZ, C. R.; SILVA, M. C. B. C.; CEBALLOS, B. S. O. Comunidade zooplânctônica de um açude do semiárido paraibano e viabilidade de seu uso como bioindicadora do estado trófico. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS HÍDRICOS DO NORDESTE, 11. 2012, João Pessoa. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2012.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011, 656p.

MARA, D. D. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Churchill Livingstone, 1974, 209p.

MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995, 222 p.

NICOLAU, A. et al. Os protozoários como ferramenta de monitorização biotecnológica da poluição: ensaios *in vitro*. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6, Lisboa, 1999. **Actas...** Lisboa: Universidade Nova. Vol. 2, p.789-798, 1999.

PARESCHI, D. C. **Caracterização da fauna de rotífera em área alagada construída para tratamento de esgoto doméstico**: Piracicaba (SP). 187f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia da Universidade de São Carlos (SP), 2004.

PIEIDADE, A. L. F. **Microbiologia de Lodos Ativados**: uma ferramenta fundamental no Gerenciamento das ETEs. AQUACOM. Disponível em: <http://www.tratamentodeagua.com.br/r10/Lib/Image/art_2014012648_microbiologia_de_lodos_ativados.pdf>. Acesso em: 13 de out. de 2015.

SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L. **Microbiology of Activated Sludge**. Ed. Kluwer, 1999, 422p.

TRATA BRASIL. **Situação Saneamento no Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento>>. Acesso em: 24 out. 2015.

VAZOLLÉR, R. F. et al. **Microbiologia de lodos ativados**. São Paulo: CETESB, 1989, 23p.

Indicadores microbianos de contaminação fecal

Diferentes tipos de microrganismos patogênicos (bactérias, vírus, protozoários e helmintos) acompanham as descargas dos esgotos municipais que contaminam as águas naturais e são por elas veiculados. Sua presença deve ser monitorada para a adoção de medidas preventivas com metas de diminuir os riscos à saúde da população, que destina essas águas para usos múltiplos, tais como beber, recreação de contato primário e agricultura irrigada de produtos a serem consumidos crus, entre outros (CRAUN; CASTRO, 1996).

O objetivo do exame microbiológico da água é verificar sua condição de uso, seja para recreação, para irrigação agrícola, aquicultura ou água potável, confirmando a ausência de microrganismos enteropatogênicos de forma que seu uso, incluída sua ingestão, não represente riscos de infecções provenientes da contaminação do manancial com fezes e esgotos domésticos (BRASIL, 2013). A Resolução CONAMA Nº 357 de 17 de março de 2005 classifica as águas do território nacional em classes de uso em função de sua qualidade, com destaque para os parâmetros microbiológicos (BRASIL, 2005a).

O saneamento básico adota barreiras sanitárias que inibem a propagação dos microrganismos patogênicos (tratamento da água para ser consumida pela maioria da população e coleta, tratamento e descarte apropriado dos esgotos) e

são essenciais para o decréscimo das doenças diarreicas. No Brasil, Sperling e Chernicharo (2000) observaram que as tecnologias de tratamento de esgotos são eficientes na remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos (DBO, DQO, SS), mas ineficientes para remover nitrogênio, fósforo e bactérias coliformes e, portanto, bactérias enteropatogênicas.

Nos esgotos domésticos e municipais, os microrganismos enteropatogênicos estão, em geral, em baixas densidades e de forma intermitente porque somente os indivíduos enfermos ou os portadores sadios os liberam nas suas excretas. Ainda, a descarga de água dos vasos sanitários provoca sua diluição. Quando esses esgotos atingem o corpo receptor experimentam outra diluição significativa que diminui ainda mais sua densidade (número de indivíduos em um volume determinado). Deve-se também considerar que os agentes patogênicos, adaptados às condições do intestino humano (pH próximo ao neutro, temperatura em torno de 35 a 37°C, ausência de luz solar e de outros fatores microbicidas, e em presença de abundantes substratos para seu metabolismo), não sobrevivem durante um longo período nas águas naturais e, portanto, podem não ser encontrados numa amostragem esporádica.

Mas, quando presentes sob condições ambientais que permitem sua multiplicação em águas poluídas, a demora na sua detecção é a causa de que, muitas vezes, os patógenos são achados e identificados após a comunidade ou populações maiores utilizarem a água contaminada e ficarem doentes algumas ou muitas pessoas (FEACHEM, 1984). São exemplos os achados de *Vibrio cholerae* na epidemia de cólera iniciada em 1991, no Peru, e que atingiu Brasil (2.013 casos e 33 óbitos) e o surto de cryptosporidiose em Milwaukee/Mi/EEUU, em 1993, com 1 milhão de habitantes dos quais 403 mil foram acometidos por forte diarreia levando a óbito em torno de 100

peessoas, depois de usarem gelo produzido com água tratada, e contaminada com efluentes de esgotos de uma Estação de Tratamento de Esgotos a montante da Estação de Tratamento de Água (MACKENZIE et al., 1994; GARCIA; CEBALLOS, 1998; LIMA; STAMFORD, 2003).

Detectar e quantificar toda a variedade de microrganismos enteropatogênicos possivelmente presentes na água e em esgotos é uma tarefa árdua, de custos elevados e demorados, com um agravante, nem sempre se obtêm resultados positivos ou que confirmem a presença de um determinado microrganismo patogênico. Essa grande diversidade de enteropatogênicos (Tabela 1) e a impossibilidade de determinar com eficiência, rapidez e segurança, tornou necessário definir microrganismos específicos, indicadores de contaminação fecal. Em consequência, foram desenvolvidos métodos para analisar água, esgotos, lodos de esgotos, alimentos e outros materiais que não dependam do isolamento e identificação dos microrganismos patogênicos e sim da detecção dos microrganismos indicadores de contaminação fecal.

A presença em água ou em outros materiais de algum dos indicadores de contaminação fecal e no ambiente em geral é aceita como indicadora da possível presença de microrganismos enteropatogênicos. Se na água ou em outras matrizes ambientais estão presentes alguns dos microrganismos indicadores, esse material está contaminado com fezes de animais homeotérmicos, incluindo o homem e/ou com esgotos domésticos. Entende-se também que quanto maior a quantidade ou densidade dos indicadores em uma água, por exemplo, maior é o risco à saúde humana: eles indicam que qualquer microrganismo patogênico que ocorre no trato intestinal pode estar presente.

Tabela 1 - Doenças veiculadas pela água e seus agentes

Doenças de origem bacteriana	
Febre tifoide	<i>Salmonella typhi</i>
Febre tifoide e paratifoide	<i>Salmonella paratyphi A e B</i>
Disenteria bacilar	<i>Shigella sp</i>
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Gastrenterites agudas e diarreias	<i>Campylobacter sp; Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella sp, Shigella sp.</i>
Doenças de origem viral	
Hepatite A e B	Vírus da hepatite A e B
Poliomielite	Vírus da poliomielite (ou poliovírus)
Gastrenterites agudas e crônicas	Vírus Norwalk; Rotavírus;
Doenças parasitárias (origem: protozoários e helmintos)	
Disenteria amebiana	<i>Entamoeba histolytica; Giardia lamblia</i>
Gastrenterites	<i>Cryptosporidium</i>
Esquistossomose (barriga de água)	<i>Schistosoma mansoni</i>
Ascariíase	<i>Ascaris lumbricoides</i>

Fonte: Brasil (2013).

Indicadores Bacterianos de Poluição Fecal

Os indicadores bacterianos de poluição fecal, pela sua origem e ecologia, devem evidenciar a contaminação por fezes e/ou por esgotos. Os requisitos básicos que devem reunir um bom indicador bacteriano de contaminação fecal são:

- Ser um componente normal da biota (flora) intestinal de indivíduos sadios;
- Estar ausente em água e ambientes não contaminados;
- Estar presente sempre que os microrganismos patogênicos intestinais estiverem presentes;
- Não se reproduzir fora do intestino dos animais homeotermos;

- Apresentar-se em número mais elevado que os patógenos intestinais para facilitar seu isolamento e quantificação;
- Ter resistência igual ou maior aos fatores ambientais que os enteropatógenos ou bactérias patogênicas do sistema digestório (apresentar taxa de morte igual ou levemente menor que os patógenos intestinais);
- Não ser patogênico;
- Ser fácil de detectar e quantificar por técnicas simples e de baixo custo.

Nenhum microrganismo reúne todas essas condições. Os principais grupos de bactérias utilizados internacionalmente como indicadores de contaminação fecal e que cumprem com alguns dos requisitos anteriores são:

- Coliformes totais;
- Coliformes termotolerantes (antes denominados coliformes fecais);
- *Escherichia coli* (*E.coli*);
- Streptococos fecais ou enterococos;
- *Clostridium perfringens* ou *Clostridium welchii*;
- *Bifidobacterium adolescentis* e outras espécies fermentadoras de manitol, por serem de origem exclusivamente humana (propostos).

Enterobactérias: bactérias do trato entérico

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grande grupo de bastonetes Gram negativos não esporulados móveis ou imóveis aeróbios ou anaeróbios fermentadores, com mais de 44 gêneros e 180 espécies, amplamente distribuídas no ambiente (solo, água, frutas, vegetais e produtos de origem animal, como a carne e ovos). Crescem bem nos meios de cultura comuns e nos meios seletivos para enterobactérias.

Fermentam a glicose com ou sem a formação de gás. A maioria é catalase positiva (exceção *Shigella dysenteriae*), oxidase negativa, e reduz o nitrato a nitrito.

Representam mais de 80% das bactérias Gram negativas de importância clínica. Diversas espécies são patogênicas para o homem. Provocam doenças diarreicas, causam infecções em feridas e em queimaduras, no trato urinário e respiratório, septicemia e meningite. São causa de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Algumas espécies são agentes de infecções gastrointestinais transmitidas por água e alimentos contaminados. Os mais frequentes são sorotipos diferentes de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, categorias diarreicogênicas de *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*. Provocam infecções hospitalares, onde predominam os gêneros e espécies de *Escherichia coli* patogênicas (dos quais existem mais de oito grupos), *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp, *Morganella morgannii*, *Citrobacter* spp.

Por ser um grupo muito diversificado, sua ecologia é bastante variável, bem como seu potencial patogênico para o homem, animais e vegetais. Muitas bactérias do grupo formam parte de biota normal do intestino dos animais homeotermos e do homem, como os coliformes e dentre eles *E. coli*, que são excretadas com as fezes em quantidades maiores a 10^{11} bactérias por grama.

No intestino e em especial no cólon, os coliformes contribuem com a fermentação de carboidratos não digeridos e participam da absorção de ácidos graxos de cadeias curtas; *E. coli* também produz vitamina K, importante na formação e manutenção dos ossos, manutenção dos vasos sanguíneos e na coagulação do sangue, entre outras propriedades.

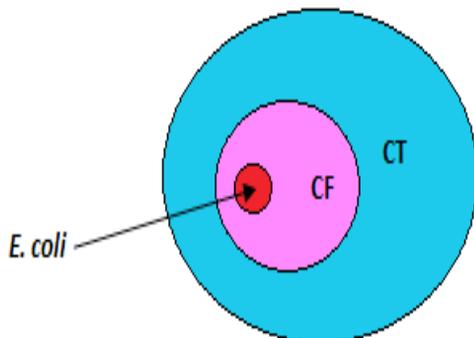
Por serem abundantes no intestino (cólon - como comensais e mutualistas) e por serem eliminados nas fezes e pertencerem ao grande grupo das enterobactérias, entre outras características, os coliformes são as bactérias escolhidas como indicadores universais de contaminação fecal.

Microrganismos indicadores de contaminação fecal: definições e aplicações

As bactérias coliformes foram descobertas em 1886, no cólon humano e de animais homeotérmicos, por Theodor Escherich (1857 – 1911), médico pediatra e bacteriologista nascido em Viena. Pela sua origem, seu número elevado nas excretas e pela sua facilidade de detecção passaram a ser usadas já em 1900 como indicadores bacterianos de contaminação fecal.

Denominados originalmente como **coliformes totais (CT)**, o grupo abrange bastonetes de 2 μm de comprimento e 1 μm de largura. São Gram negativos que fermentam a lactose a 35°C com produção de ácido e gás. Esse grande grupo contém um subgrupo chamado inicialmente de coliformes fecais e atualmente denominado de coliformes termotolerantes, e a espécie *Escherichia coli* é considerada a única que confirma a contaminação fecal. A Figura 1 representa os três grupos de coliformes atualmente em uso, coliformes totais (CT), coliformes termotolerantes (antes denominados de coliformes fecais - CF) e *Escherichia coli*.

Figura 1- Coliformes totais (grande grupo taxonômico e bioquímico) que incluem coliformes termotolerantes e *E. coli*.

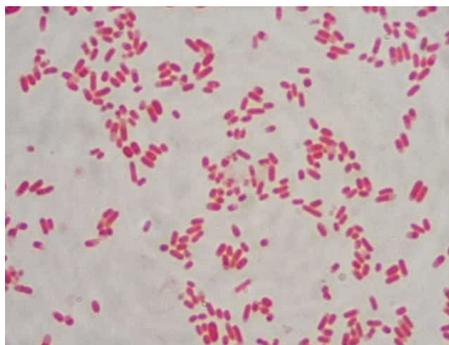


Fonte: Autoras.

Coliformes Totais (CT)

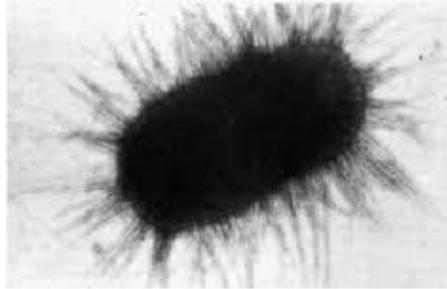
Definição: são bastonetes Gram negativos, não esporulados, aeróbios facultativos que utilizam opcionalmente oxigênio molecular no seu metabolismo, mas são preferentemente fermentadores de carboidratos (com destaque para lactose), oxídases negativas (detectam a presença da enzima citocromo oxidase que é a última enzima da cadeia de transporte de elétrons que transferem esses elétrons ao oxigênio nos organismos aeróbios estritos) e redutores de nitratos, capazes de crescerem na presença de sais biliares fermentando a lactose a 35°-37°C com produção de ácidos e gás. Têm ampla distribuição na natureza (águas, solo, folhas) e estão presentes no intestino de animais homeotermos, são excretados com as fezes em altas concentrações. Todos os coliformes possuem a enzima β -galactosidase que cliva o substrato Ortonitrofenil-galacto-piranosídeo (ONPG) e libera ortonitrofenil usado para identificação rápida do grupo. As Figuras 2 e 3 mostram respectivamente uma bactéria coliforme (*E. coli*) em uma lâmina com coloração de Gram observada ao microscópio comum e ao microscópio eletrônico evidenciando os flagelos peritricos.

Figura 2 - *E. coli* (microscopia óptica, x 2.000)



Fonte: Madigan et al. (2010).

Figura 3 - *E. coli* (microscopia eletrônica) - flagelos peritricos



Fonte: Madigan et al. (2010).

Significado sanitário dos CT: utilizados logo após sua descoberta como indicadores universais de contaminação fecal, foi posteriormente verificada sua capacidade de se multiplicar no ambiente. Atualmente o grupo é definido na Portaria Nº 2914 /2011 – MS como Indicador de eficiência de tratamento (BRASIL, 2011). Seu uso ficou limitado ao controle da qualidade sanitária da água potável nos locais citados a seguir, entre outras aplicações:

- Na saída do tratamento da água na ETA, é um indicador útil para a avaliação da eficiência do sistema de potabilização;
- No sistema de distribuição (reservatórios e rede), para indicar a integridade desse sistema e as condições higiênicas da água;
- Nos sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimentos, para indicar a integridade do sistema e as condições higiênicas da água;
- Em poços, para indicar condições higiênicas da água e similares.

Coliformes Termotolerantes (ex-coliformes fecais - cf, hoje coliterm)

Definição: subgrupo de bactérias coliformes, de ocorrência mais restrita às fezes humanas e animais de sangue quente. Esse fato os torna indicadores razoáveis de contaminação fecal. São bactérias Gram negativas, em forma de bacilos de 1x 2µm, que integram o grande grupo dos coliformes totais (CT). Fermentam a lactose com produção de ácido, aldeídos e gás a 37°C e a 44,5°C, são oxidasas negativas, reduzem nitratos a nitritos, possuem atividade da enzima β-galactosidase. Podem crescer em meios contendo agentes tensoativos (sais biliares a 2%) iguais aos CT.

Significado sanitário dos ColiTerm: evidenciam poluição com fezes de seres humanos e de animais homeotérmicos e por esgotos domésticos e municipais; portanto, são bons indicadores do risco humano e animal de contaminação com microrganismos enteropatogênicos de veiculação hídrica. Por crescerem a 44,5°C, são denominados coliformes termotolerantes os quais se diferenciam dos CT, e essa propriedade é o diferencial usado na técnica de isolamento do subgrupo termotolerante dos totais.

Aplicação: avaliação da contaminação fecal em águas superficiais lênticas, lóxicas, de estuários e marinhas com poluição fecal recente (limitação imposta pela salinidade), monitoramento de águas recreacionais como piscinas, praias e lagos. É um indicador fundamental para avaliar as condições de balneabilidade em águas doces, de acordo com os padrões nacionais. São usados especificamente para:

- Monitoramento da qualidade de água para consumo humano, da rede de distribuição, de águas minerais, de poços, alimentos em geral, etc.;

- Avaliação da qualidade bacteriológica de águas destinadas à irrigação, dessedentação de gado, criação de ostras e mariscos;
- Avaliação da eficiência dos sistemas de tratamento do esgoto (ETEs);
- Avaliação da qualidade sanitária de águas de reúso.

Escherichia coli (*E. coli*)

Definição: *E. coli* forma parte do subgrupo dos coliformes fecais, sendo o integrante mais numeroso. Pertencente à família Enterobacteriaceae e, como todos os coliformes, caracteriza-se pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glucuronidase. Enquanto a primeira é comum a todos os coliformes, a segunda é exclusiva de *E. coli*. Esta última enzima age sobre o substrato 4-Methyl-Umbilipheril- β -D - Glucoronosideo (MUG) e libera o 4-Methyl-Umbilipheril que produz luminescência azul intensa quando iluminado com UV de λ 360 nm, identificando *E. coli*. Essas características metabólicas permitiram o desenvolvimento dos testes cromogênicos ou de substrato definido para sua identificação, combinando os dois substratos alvos para as duas enzimas. Produzem indol a partir do aminoácido triptofano. É a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos, onde ocorre em densidades elevadas.

Sua presença em água, solo e alimentos, entre outros ambientes e materiais, confirma a contaminação fecal e indica provável presença de microrganismos patogênicos. Quanto maior o número de *E. coli*, maior a probabilidade de se encontrar microrganismos enteropatógenos.

Significado sanitário da *E. coli*: são indicadores específicos de contaminação fecal humana ou de animais homeotermos em qualquer tipo de material.

Aquelas *E. coli* que formam parte da biota intestinal não são patogênicos e durante muito tempo foram consideradas comensais do sistema digestório. Atualmente, passaram à categoria de microrganismos mutualistas pela sua associação com o metabolismo dos alimentos no intestino dos homeotermos seja pela fermentação complementar dos açúcares seja como facilitadores da absorção de lipídeos simples, e como produtores de vitamina K.

Entretanto, existem linhagens ou cepas patogênicas das quais se conhecem oito variedades, todas de veiculação hídrica, por alimentos e fômites, e pelo contato pessoa a pessoa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Aplicação para *E. coli*: As mesmas que para coliformes termotolerantes (ex-fecais);

Em águas recreacionais doces, a detecção de *E. coli* permite estabelecer uma relação direta entre sua densidade e riscos de doenças gastrointestinais em nadadores.

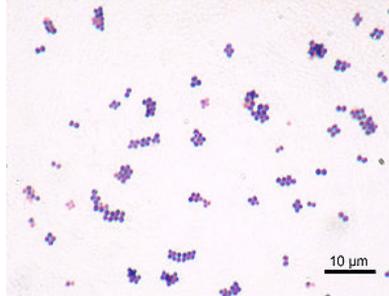
Streptococos fecais (EF)

Definição: são cocos Gram positivos (Figura 4) presentes em fezes humanas e animais. O grupo está formado por várias espécies de origem animal, ambiental e humano: *S. faecalis* (subespécies *zymogenes* e *liquefaciens*), *S. faecium*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. gallinarum*.

- Todos eles pertencem ao grupo D da classificação antigênica de Lancefield, baseada na presença do antígeno D.
- Dentro do grupo se destacam o subgrupo dos enterococos, formado pelas espécies: *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* e *S. avium*, mais resistentes que os coliformes totais e os termotolerantes às condições ambientais externas (pH, temperatura, salinidade etc).

- *S. bovis* e *S. equinus* são menos resistentes e morrem facilmente após serem excretados.

Figura 4 - *Streptococcus* sp (cocos Gram positivos)



Fonte: Madigan et al. (2010).

Significado sanitário Estreptococos fecais:

- São indicadores de contaminação fecal.
- Sua detecção é um parâmetro adicional a coliformes termotolerantes, particularmente quando a contaminação é intermitente. Nesse caso, coliformes totais e termotolerantes podem estar ausentes e em águas salinas e salobras, principalmente águas marinhas.

Enterococos

Definição: os enterococos constituem um subgrupo dos estreptococos fecais pertencentes ao grupo D de Lancefield. Possuem a propriedade de crescer na faixa de 10° a 45°C, pH 9,6 e em concentrações de 6,5% de Cloreto de Sódio. Reduzem o azul de metileno 0,1% em leite e sobrevivem a 60°C por 30 minutos. O subgrupo abrange as espécies: *S. faecalis* (e suas variedades *liquefaciens* e *zymogenes*), *S. faecium*, *S. gallinarum* e *S. avium*.

Significado sanitário dos enterococos: os enterococos são bons indicadores de contaminação fecal em águas, em especial em águas recreacionais marinhas. Devido à sua elevada resistência ao sal, apresentam melhor correlação que os coliformes com a ocorrência de doenças gastrointestinais em nadadores em águas salgadas. A Resolução CONAMA Nº 274/2000 estabelece os padrões de qualidade de águas recreacionais baseadas na concentração de enterococos (BRASIL, 2001).

Aplicação Streptococos fecais e enterococos

- As mesmas que para coliformes termotolerantes.
- Confirmação da origem fecal da contaminação, quando os resultados de coliformes totais e termotolerantes são duvidosos.
- Avaliação da qualidade de águas subterrâneas (pela sua maior resistência no solo tornam-se indicadores confiáveis).

***Clostridium perfringens* ou *Clostridium welchii* (C.P.)**

Definição: Bastonetes Gram positivos, esporulados, anaeróbios que fermentam lactose e inositol com produção de gás. Produzem fermentação turbulenta do leite, reduzem os nitratos (atividade desnitrificante), reduzem sulfitos da água, produzem lecitinase e fosfatase ácida e hidrolisam a gelatina.

Significado sanitário do *Clostridium perfringens*: na microbiologia da água, *C. perfringens* ou *C. welchi* é utilizado como indicador de poluição fecal antiga devido à sua capacidade de formar esporos. Esta propriedade lhe confere grande resistência às condições ambientais adversas. Também pode ser usado como um marcador específico em estudos de desinfecção, de eficiência de tratamento de esgotos, etc. Esta

bactéria pode estar presente em águas, e amostras ambientais contaminadas com material fecal nas quais CT, Coliformes termotolerantes, *E. coli* e estreptococos já tenham morrido.

Aplicação de *Clostridium perfringens*:

- Avaliação da qualidade da água de novas fontes de abastecimento;
- Detecção da contaminação em sedimentos marinhos e resíduos industriais;
- Análises da qualidade de águas recicladas e fontes reconhecidamente poluídas;
- Avaliação da qualidade de águas minerais.

***Pseudomonas aeruginosa* (PA)**

Definição: São bastonetes Gram negativos, aeróbios, móveis por flagelos polares, oxidase e catalase positivos. A maioria das cepas produzem pigmentos esverdeados (fluoresceínas e piocianinas). Crescem bem a 37°C e 41 °C, mas não a 4°C. Apresentam elevada resistência a antibióticos (codificada por plasmídeos) e a desinfetantes. Portanto, são bons indicadores do grau de higiene de águas de piscinas e ambientes em geral expostos à contaminação. Toleram valores relativamente elevados de pH (pH = 8,5).

Significado sanitário de *Pseudomonas aeruginosa*:

- Patógenos oportunistas responsáveis por infecções de feridas e otites externas, particularmente em nadadores. É importante seu controle em águas destinadas à recreação de contato primário.
- Causam infecções fatais como septicemias, particularmente em crianças e adultos debilitados por queimaduras, tratamento prolongado com antibióticos e imunossupressores.

Aplicação de *Pseudomonas aeruginosa*:

- Avaliação da qualidade bacteriológica de águas recreacionais, águas industriais e corpos receptores de esgotos domésticos, hospitalares e industriais;
- Avaliação da qualidade bacteriológica de águas potáveis e águas minerais;
- Monitoramento da rede de abastecimento, quando esta bactéria é detectada em testes prévios.

***Staphylococcus aureus* (SA)**

Definição: são cocos Gram positivos, catalase positiva, fermentadores de glicose e manitol em anaerobiose. São coagulase positivos e produzem uma nuclease termorresistente.

Significado sanitário de *Staphylococcus aureus*: são habitantes normais da pele, nariz e intestino de indivíduos sadios. Causam infecções piógenas na pele, olhos e ouvidos.

Aplicação de *Staphylococcus aureus*:

- Apresentam as mesmas aplicações que CT, CF, e *E. coli*;
- Avaliação da qualidade sanitária de águas de piscinas e recreacionais em geral;
- Avaliação da eficiência da desinfecção em piscinas, devido à sua alta resistência ao cloro e outros desinfetantes;
- Avaliação da eficiência do processo de desinfecção.

Colifagos

Definição: os colifagos são vírus (bacteriófagos) que infectam e se replicam em bactérias coliformes, e estão presentes sempre que coliformes totais, fecais e *E. coli* estão presentes.

Em 1917, D’Herelle observou um processo lítico não específico em culturas bacterianas em meio sólido: culturas confluentes apresentavam aleatoriamente placas transparentes, indicando destruição de bactérias. Esse “princípio lítico” podia ser transferido repetidas vezes de uma cultura para outra. D’Herelle levantou a hipótese de tratar-se de um vírus patogênico, específico, o qual após infectar e multiplicar-se no interior da bactéria hospedeira, causava sua lise e a liberação de novos vírus. Estes infectavam novas células, propagando, dessa forma, a destruição celular. Esses vírus foram denominados genericamente de bacteriófagos: vírus que atacam bactérias. Colifagos é a denominação daqueles bacteriófagos que atacam especificamente bactérias coliformes.

Atualmente se sabe que após a infecção da bactéria pelo vírus, esta não apresenta alterações aparentes durante 15 minutos - 1 hora. Nesse período, ocorre a multiplicação viral e o tempo necessário para que ela se verifique depende do tipo e estado da célula hospedeira, do vírus e das condições da cultura (pH, temperatura, nutrientes, etc.). A liberação dos novos vírus ocorre de forma súbita com a lise celular. Os milhares de fagos produzidos atacam bactérias vizinhas, repetindo-se o ciclo. A destruição de certo número de bactérias produz uma área transparente ou “placa de lise” facilmente visível a olho nu.

As águas poluídas apresentam diversos tipos de colifagos, tendo sido isolados tipos somáticos e F. específicos (que se fixam ao pilus sexual de *E. coli*). A técnica de quantificação é simples, acessível e rápida (6 horas).

Significado sanitário de colifagos:

- Sua presença, numa água, está associada à presença de coliformes totais e termotolerantes e *E. coli*. Portanto, podem ser usados como indicadores da

qualidade sanitária de águas doces, salobras e salinas com resultados em 8 a 18 horas;

- São mais resistentes que os coliformes à ação do cloro, sendo bons indicadores da eficiência da desinfecção. As taxas de sobrevivência são diferentes entre coliformes e colifagos em águas naturais e águas submetidas à desinfecção;
- Seriam bons indicadores da provável presença de enterovírus;
- Serviriam como modelo do comportamento de enterovírus em sistemas de tratamento.

Legislações sobre qualidade microbiológica das águas para diferentes usos

1 - A Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde - legisla sobre a qualidade da água potável no território nacional: “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. Aplica-se à água destinada ao consumo humano, proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento de água. Estabelece ausência de coliformes termotolerantes e de *E. coli* nas águas destinadas ao consumo humano (BRASIL, 2011).

As disposições dessa Portaria não se aplicam à água mineral natural, à água natural e às águas adicionadas de sais destinadas ao consumo humano após o envasamento, e a outras águas utilizadas como matéria-prima para elaboração de produtos, que são legisladas pela Resolução (RDC) nº 274 de 22 de setembro de 2005 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2005b).

Em relação à Portaria 2914/2011-MS, o Capítulo V refere-se à qualidade da água potável. Alguns artigos e parágrafos selecionados são citados e comentados a seguir:

Portaria 2914/2011-MS - Capítulo V - Do Padrão de Potabilidade (BRASIL, 2011)

Art. 27. A água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico, conforme disposto no Anexo I e demais disposições desta Portaria.

§ 1º No controle da qualidade da água, quando forem detectadas amostras com resultado positivo para coliformes totais, mesmo em ensaios presuntivos, ações corretivas devem ser adotadas e novas amostras devem ser coletadas em dias imediatamente sucessivos até que revelem resultados satisfatórios.

§ 6º Quando o padrão microbiológico estabelecido no Anexo I desta Portaria for violado, os responsáveis pelos sistemas e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água para consumo humano devem informar à autoridade de saúde pública as medidas corretivas tomadas.

Anexo I

Água potável: *E. coli* ausência em 100 mL.

Água tratada na saída do tratamento: *E. coli* e Coliformes totais: ausentes em 100 mL.

Água tratada no sistema de distribuição e rede:
Coliformes totais em:

- 1) Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes: apenas uma amostra entre as examinadas no mês poderá apresentar resultado positivo.
- 2) Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem mais de 20.000 habitantes: ausência em 95% das amostras coletadas em um mês.

§ 7º Quando houver interpretação duvidosa nas reações típicas dos ensaios analíticos na determinação de coliformes totais e Escherichia coli, deve-se fazer a coleta.

Art. 28. A determinação de bactérias ou contagem de bactérias totais ou contagem padrão (Capítulo 7 deste manual) deve ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

§ 1º A contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada em 20% (vinte por cento) das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição (reservatório e rede).

§ 3º Alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para identificação de irregularidade e providências devem ser adotadas para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição (reservatório

e rede), recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL.

Art. 29. Recomenda-se a inclusão de monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.

O artigo 30º faz referência à turbidez da água, parâmetro este associado às partículas dissolvidas ou em suspensão na água, entre elas os microrganismos. O controle da turbidez e o estabelecimento de limites rigorosos foram adotados após o surto de cryptosporidiose em Milwaukee/WI/USA em 1996, por ter sido a turbidez a única variável qualitativa que expressou uma anomalia (picos altos), associados à presença dos oocistos do protozoário. Os valores fixados (Valores Máximos Permitidos – VMP) estão citados no Anexo II, a seguir.

Anexo II

Tratamento de água

Desinfecção para águas subterrâneas: 1,0 uT em 95% das amostras.

Filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta): 0,5 uT em 95% das amostras.

Filtração lenta: 1 uT em 95% das amostras.

Art. 30. Para a garantia da qualidade microbiológica da água, em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser atendido o padrão de turbidez expresso no Anexo II e devem ser observadas as demais exigências contidas nesta Portaria.

§ 1º. Entre os 5% (cinco por cento) dos valores permitidos de turbidez superiores ao VMP estabelecido no Anexo II desta Portaria, para água subterrânea com desinfecção, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser de 5,0 uT, assegurado, simultaneamente, o atendimento ao VMP de 5,0 uT em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede).

§ 3º. O atendimento do percentual de aceitação do limite de turbidez, expresso no Anexo II desta Portaria, deve ser verificado mensalmente com base em amostras, preferencialmente no efluente individual de cada unidade de filtração, no mínimo diariamente para desinfecção ou filtração lenta e no mínimo a cada duas horas para filtração rápida.

*No Art. 31 § 1, se destaca a importância de avaliar cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* quando a média geométrica de *E. coli* é alta.*

Art. 31. Os sistemas de abastecimento e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais devem realizar monitoramento mensal de Escherichia coli no(s) ponto(s) de captação de água.

§ 1º. Quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1000 Escherichia coli/100 mL, deve-se realizar monitoramento de cistos de Giárdia spp e oocistos de Cryptosporidium spp no(s) ponto(s) de captação de água.

§ 2º. Quando a média aritmética da concentração de oocistos de Cryptosporidium spp for maior ou igual a 3,0 oocistos/L no(s) pontos(s) de captação de água, recomenda-se a obtenção de efluente em filtração rápida com valor de turbidez menor ou igual a 0,3 uT em 95% (noventa e cinco por cento) das amostras mensais ou uso de processo de desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos de Cryptosporidium spp.

§ 3º. Entre os 5% (cinco por cento) das amostras que podem apresentar valores de turbidez superiores ao VMP estabelecido no § 2º do art. 30 desta Portaria, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser menor ou igual a 1,0 uT, para filtração rápida e menor ou igual a 2,0 uT para filtração lenta.

§ 4º. A concentração média de oocistos de Cryptosporidium spp referida no § 2º deste artigo deve ser calculada considerando um número mínimo de 24 (vinte e quatro) amostras uniformemente coletadas ao longo de um período mínimo de um ano e máximo de dois anos.

Art. 32. § 4º. No caso da desinfecção por radiação ultravioleta, deve ser observada a dose mínima de 1,5

*mL/cm² para 0,5 log de inativação de cisto de *Giardia* spp.*

*Art. 33. Os sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimento de água supridas por manancial subterrâneo com ausência de contaminação por *Escherichia coli* devem realizar cloração da água mantendo o residual mínimo do sistema de distribuição (reservatório e rede), conforme as disposições contidas no art. 34 desta Portaria.*

*§ 1º. Quando o manancial subterrâneo apresentar contaminação por *Escherichia coli*, no controle do processo de desinfecção da água, devem ser observados os valores do produto de concentração residual de desinfetante na saída do tanque de contato e o tempo de contato expressos nos Anexos IV, V e VI desta Portaria ou a dose mínima de radiação ultravioleta expressa no § 4º do art. 32 desta Portaria.*

O artigo 34 se refere à manutenção permanente de uma faixa de cloro residual como garantia de evitar riscos de contaminação bacteriana da água tratada.

Art. 34. É obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre ou 2 mg/L de cloro residual combinado ou de 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede).

2 - Resolução CONAMA No 357 de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005a)

Classifica as águas do território nacional em águas doces, salobras e salinas. As definições segundo seu conteúdo em sais é a seguinte:

- a) águas doces: aquelas águas com salinidade igual ou inferior a 0,5‰;
- b) águas salobras: as que possuem salinidade entre 0,5‰ e 30‰;
- c) águas salinas, as de salinidade igual ou superior a 30‰.

Por sua vez, essas três classes são subdivididas em treze classes de qualidade de acordo com os usos a que se destinam essas águas. Apresenta-se a seguir a classificação das águas doces, salobra e salinas segundo a citada resolução, no seu Capítulo II, que se refere aos usos destinados para cada classe e se faz referência ao Capítulo III - Das Condições e Padrões de Qualidade das Águas, que define o Valor Máximo Permitido (VMP/100 mL) de bactérias indicadoras de contaminação fecal para cada uma das classes e dos usos.

Resolução CONAMA 357/2005

Capítulo II - Da Classificação dos Corpos de Água

Art.3o. As águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade.

Parágrafo único. As águas de melhor qualidade podem ser aproveitadas em uso menos exigente, desde que este não prejudique a qualidade da água, atendidos outros requisitos pertinentes.

Art. 4o. As águas doces são classificadas em:

I - Classe especial: águas destinadas:

a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção;

b) a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e,

c) a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

Condições de qualidade: Nas águas de classe especial, deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água.

II - Classe 1: águas que podem ser destinadas:

a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado;

b) a proteção das comunidades aquáticas;

c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA Nº 274, de 2000 (BRASIL, 2001);

- d) a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e
- e) a proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

Condições de qualidade microbiológica para águas doces classe 1: coliformes termotolerantes para o uso de recreação de contato primário deverão ser obedecidos os padrões de qualidade de balneabilidade, previstos na Resolução CONAMA N° 274, de 2000 (BRASIL, 2001). Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais, de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

III - Classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
- b) a proteção das comunidades aquáticas;
- c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA N° 274, de 2000;
- d) a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e
- e) a aquicultura e a atividade de pesca.

Condições de qualidade microbiológica para águas doces classe 2: coliformes termotolerantes: para uso de recreação de contato primário, deverá ser obedecida a Resolução

CONAMA N° 274, de 2000 (BRASIL, 2001). Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

IV - Classe 3: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- b) a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) a pesca amadora;
- d) a recreação de contato secundário; e
- e) a dessedentação de animais.

Condições de qualidade microbiológica para águas doces classe 3: coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato secundário, não deverá ser excedido um limite de 2500 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Para dessedentação de animais criados confinados não deverá ser excedido o limite de 1000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 4000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes

termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

V - classe 4: águas que podem ser destinadas:

- a) à navegação;
- b) à harmonia paisagística.

Condições de qualidade microbiológica para águas doces classe 4: sem restrições visto que seus usos não são de risco para seres humanos e animais, os que não devem ter contato com essas águas.

Seção II

Das Águas Salinas

Art. 5º. As águas salinas são assim classificadas:

I - Classe especial: águas destinadas:

- a) *à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral;*
- b) *à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.*

Condições de qualidade microbiológica para águas salinas classe especial: nas águas da classe especial deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água.

II - Classe 1: águas que podem ser destinadas:

- a) à recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA Nº 274, de 2000;
- b) à proteção das comunidades aquáticas; e
- c) à aqüicultura e a atividade de pesca.

Condições de qualidade microbiológica para águas salinas classe 1: coliformes termotolerantes: para o uso

de recreação de contato primário, deverá ser obedecida a Resolução CONAMA Nº 274, de 2000.

Para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros.

Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

III - Classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) à pesca amadora; e
- b) à recreação de contato secundário.

Condições de qualidade microbiológica para águas salinas classe 2: coliformes termotolerantes: não deverá exceder o limite de 2500 por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

E. coli poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

IV - Classe 3: águas que podem ser destinadas:

- a) à navegação;
- b) à harmonia paisagística.

Condições de qualidade microbiológica para águas salinas classe 3: coliformes termotolerantes: não deverá ser excedido um limite de 4.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

Seção II

Das Águas Salobras

Art. 6º. As águas salobras são assim classificadas:

I - classe especial: águas destinadas:

- a) *à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e,*
- b) *à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.*

Condições de qualidade microbiológica para águas salobras classe especial: Nas águas de classe especial, deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água.

II - Classe 1: águas que podem ser destinadas:

- a) *à recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA Nº 274, de 2000;*
- b) *à proteção das comunidades aquáticas;*
- c) *à aquicultura e a atividade de pesca;*
- d) *ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; e*
- e) *à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e a irrigação de parques, jardins, campos de esporte e*

lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.

Condições de qualidade microbiológica para águas salobras classe1: coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato primário, deverá ser obedecida a Resolução CONAMA Nº 274, de 2000.

Para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras.

Para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, bem como para a irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto, não deverá ser excedido o valor de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL.

Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

III - Classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) à pesca amadora;
- b) à recreação de contato secundário.

Condições de qualidade microbiológica para águas salobras classe 2: coliformes termotolerantes: não deverá ser

excedido um limite de 2500 por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

IV - Classe 3: águas que podem ser destinadas:

- a) à navegação;
- b) à harmonia paisagística.

Condições de qualidade microbiológica para águas salobras classe 3: coliformes termotolerantes: não deverá ser excedido um limite de 4.000 coliformes termotolerantes por 100 mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

Resolução Conama 274/2000 - indicadores bacterianos de contaminação fecal em águas recreacionais (Brasil, 2001)

Águas recreacionais são águas superficiais doces de rios e de lagos e águas marinhas destinadas à natação, esqui aquático e outros esportes na água. São também águas recreacionais as de piscinas ao ar livre ou internas aquecidas ou não e as de piscinas de hidroterapia.

Tradicionalmente, a qualidade sanitária ou microbiológica das águas doces é monitorada através da detecção e quantificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes e com a contagem padrão de bactérias heterótrofas. A detecção dos dois primeiros grupos de bactérias indica a qualidade sanitária das águas e em particular daquelas destinadas ao

consumo humano, que devem ser potáveis e, portanto, apresentarem os padrões de qualidade estabelecida pela Portaria 2914/2011, que exigem a ausência dos indicadores fecais nas águas dos sistemas coletivos (redes) de distribuição (BRASIL, 2011).

Observa-se, nos parágrafos que seguem, a introdução de um “novo” indicador fecal a ser quantificado. A quantificação de enterococos, um novo indicador de contaminação fecal, para águas marinhas, ou seja, para águas com elevada concentração de sais.

Durante a última epidemia de cólera na América Latina, iniciada em 1991, observaram-se em diversas praias ausência de bactérias coliformes e presença de *Vibrio cholerae*. Os coliformes estavam indicando situações falsas negativas. Essa discrepância deve-se às características ecológicas de cada grupo de bactérias: enquanto os coliformes são bactérias intestinais adaptadas às condições do cólon humano e outros homeotermos, de abundantes nutrientes, pH próximo ao neutro e baixa salinidade, o *Vibrio cholerae* é de origem marinha e, portanto, próprio de água salgadas. A baixa resistência dos coliformes às águas salinas impede seu uso como indicadores de contaminação fecal em outras águas que não forem doces. Já os enterococos têm essa propriedade e foram aceitos internacionalmente como indicadores sanitários de águas marinhas e salobras em geral (PINTO; OLIVEIRA, 2011; BONILLA et al., 2007).

A Resolução CONAMA N^o 274/2000 legisla as águas de recreação (BRASIL, 2001) nos seguintes termos:

Art.2^o: As águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário) terão sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria.

§ 1^o As águas consideradas próprias poderão ser subdivididas nas seguintes categorias:

- a. **Excelente:** quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver no máximo 250 coliformes fecais (termotolerantes) ou 200 *Escherichia coli* ou 25 enterococos por 100 mililitros (este é indicado para águas salobras e salinas);
- b. **Muito Boa:** quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 400 *Escherichia coli* ou 50 enterococos por 100 mililitros;
- c. **Satisfatória:** quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver no máximo 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos por 100 mililitros.

§ 2º. Quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas, de acordo com o critério mais restritivo.

§ 3º. Os padrões referentes aos enterococos aplicam-se, somente, às águas marinhas.

§ 4º. As águas serão consideradas impróprias para recreação quando, no trecho avaliado, for verificada uma das seguintes ocorrências:

- a. Não atendimento aos critérios estabelecidos para as águas próprias;
- b. O valor obtido na última amostragem for superior a 2.500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 2.000 *Escherichia coli* ou 400 enterococos por 100 mililitros;

- c. *Incidência elevada ou anormal, na região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias;*
- d. *Presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação;*
- e. *pH < 6,0 ou pH > 9,0 (águas doces), à exceção das condições naturais;*
- f. *Floração de algas e cianobactérias ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana; e,*
- g. *Outros fatores que contraindiquem, temporária ou permanentemente, o exercício da recreação de contato primário.*

§ 5o. Nas praias ou balneários sistematicamente impróprios, recomenda-se a pesquisa de organismos patogênicos.

Art. 3o. Os trechos das praias e dos balneários serão interditados se o órgão de controle ambiental, em quaisquer das suas instâncias (municipal, estadual ou federal), constatar que a má qualidade das águas de recreação de contato primário justifica a medida.

§ 1o. Consideram-se ainda, como passíveis de interdição, os trechos em que ocorram acidentes de médio e grande porte, tais como: derramamento de óleo e extravasamento de esgoto, a ocorrência de toxicidade ou formação de nata decorrente de floração de algas ou outros organismos e, no caso de águas doces, a presença de moluscos transmissores potenciais de esquistossomose e outras doenças de veiculação hídrica.

§ 2o. A interdição e a sinalização, por qualquer um dos motivos mencionados no caput e no § 1º deste artigo, devem ser efetivadas, pelo órgão de controle ambiental competente.

Art. 4o. Quando a deterioração da qualidade das praias ou balneários ficar caracterizada como decorrência da lavagem de vias públicas pelas águas da chuva, ou em consequência de outra causa qualquer, essa circunstância deverá ser mencionada no boletim de condição das praias e balneários, assim como qualquer outra que o órgão de controle ambiental julgar relevante.

Art. 5o. A amostragem será feita, preferencialmente, nos dias de maior afluência do público às praias ou balneários, a critério do órgão de controle ambiental competente.

Parágrafo único. A amostragem deverá ser efetuada em local que apresentar a isóbata de um metro e onde houver banhistas.

Art. 6o. Os resultados dos exames poderão, também, abranger períodos menores que cinco semanas, desde que cada um desses períodos seja especificado e tenham sido colhidas e examinadas, pelo menos, cinco amostras maior concentração durante o tempo mencionado, com intervalo mínimo de 24 horas entre as amostragens.

Art. 7o. Os métodos de amostragem e análise das águas devem ser os especificados nas normas aprovadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial-INMETRO ou, na ausência destas, no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA-AWWA-WPCF, 2012).

Art. 8o. Recomenda-se aos órgãos ambientais a avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas da areia, para futuras padronizações.

Art. 9o. Aos órgãos de controle ambiental compete a aplicação desta Resolução, cabendo-lhes a divulgação das condições de balneabilidade das praias e dos balneários e a fiscalização para o cumprimento da legislação pertinente.

Art. 10. Na ausência ou omissão do órgão de controle ambiental, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA atuará, diretamente, em caráter supletivo.

Art. 11. Os órgãos de controle ambiental manterão o IBAMA informado sobre as condições de balneabilidade dos corpos de água.

Art. 12. A União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios articular-se-ão entre si e com a sociedade, para definir e implementar as ações decorrentes desta Resolução.

Art. 13. O não cumprimento do disposto nesta Resolução sujeitará os infratores às sanções previstas nas Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981; 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e no Decreto no 3.179, de 21 de setembro de 1999.

Tornam-se necessários microrganismos que indiquem riscos à saúde pelo contato direto do indivíduo com a água e não apenas pela ingestão da mesma. Foram sugeridos, como indicadores adicionais aos coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Também são indicadores úteis os colifagos, pois além de indicarem poluição fecal, sua presença sugere a presença de enterovírus. Algumas doenças virais foram associadas com águas recreacionais contaminadas: foram registradas infecções com vírus Coxsackie A e B, Adenovírus tipo 3 e 4, hepatite A e vários tipos de gastroenterites de origem viral, mas não existem testes específicos. Mais recentemente, foram relatados casos de meningites em nadadores, causadas por amebas de vida livre: *Naegleriaspp* e a *Acanthamoeba spp*, que em situações específicas podem ser identificadas.

Existem também relatos de transmissão por águas recreacionais de *Mycobacterium*, de leveduras como *Cândida albicans* e diversos fungos filamentosos. A detecção destes microrganismos fornece importantes informações

complementares sobre o grau de contaminação destas águas, contudo torna-se difícil seu isolamento no monitoramento de rotina.

Resoluções (RDC) nº 274 de 22 de setembro de 2005 da diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Brasil, 2005b)

A Resolução Nº 274/2005 – ANVISA (BRASIL, 2005b), refere-se ao “Regulamento Técnico para Águas Envasadas e Gelo”. Publicação no Diário Oficial da União - Poder Executivo, em 23 de setembro de 2005, seu alcance é definir as características de qualidade que devem obedecer à Água Mineral Natural, a Água Natural, a Água Adicionada de Sais envasadas e o gelo para consumo humano.

Apresenta as seguintes definições:

1 - Água Mineral Natural: é a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando as flutuações naturais.

2 - Água Natural: é a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, em níveis inferiores aos mínimos estabelecidos para água mineral natural. O conteúdo dos constituintes pode ter flutuações naturais.

3 - Água Adicionada de Sais: é a água para consumo humano, preparada e envasada, contendo um ou mais dos compostos previstos no item 5.3.2 da Resolução Nº

274/2005. Não deve conter açúcares, adoçantes, aromas ou outros.

4- Gelo: água em estado sólido (BRASIL, 2005b),

A Resolução N^o 274/2005 – ANVISA estabelece que Água Mineral Natural e a Água Natural envasadas não devem apresentar risco à saúde do consumidor e devem estar em conformidade com as características microbiológicas descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características microbiológicas para água mineral natural e água natural

Microrganismo	Amostra indicativa Limites	Amostra representativa			
		N	c	m	M
<i>E. coli</i> /Coli. Term 100 mL	Ausente	5	0	-----	Ausente
Coli. Totais/100 mL	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1 NMP	5	1	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1 NMP	2 UFC ou 2,2 NMP
Enterococos/100mL	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1NMP	5	1	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1 NMP	2UFC ou 2,2 NMP
<i>P.aeruginosa</i> /100mL	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1NMP	5	1	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1 NMP	2 UFC ou 2,2 NMP
<i>Clostridium</i> sulfito redutores ou <i>C. perfringens</i>	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1NMP	5	1	Ausente ou <1,0 UFC; < 1,1 NMP	2 UFC ou 2,2 NMP

Fonte: Resolução N^o 274/2005 (BRASIL, 2005b).

N: número de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente. c: número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores “m” e “M”.

m: limite inferior (mínimo) aceitável. Valor que separa qualidade satisfatória de qualidade marginal do produto. Valores abaixo do limite “m” são desejáveis. M: limite superior (máximo) aceitável. Valores acima de “M” não são aceitos. Observa-se que *E. coli* deve estar ausente e termotolerantes devem estar em concentrações inferiores 1.1 NMP/100 mL.

Limitações das Bactérias Indicadoras de Contaminação Fecal

A qualidade microbiológica da água é avaliada pela presença ou ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal, com destaque para coliformes e *Escherichia coli*, sendo que uma água potável deve estar isenta dessas bactérias. Em consequência, estarão também ausentes os microrganismos patogênicos. Identifica-se assim a ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal com a ausência de patógenos.

Considera-se atualmente que essa abordagem é insuficiente para a avaliação da qualidade da água tratada, onde se busca verificar a eficiência do tratamento visto que cistos e oocistos de protozoários e das bactérias e dos vírus não são removidos ou eliminados nas mesmas etapas ao longo das operações do tratamento convencional.

Para que um microrganismo seja um bom indicador da eficiência do tratamento na eliminação de todos os patógenos, ele deve ser mais resistente ao tratamento do que os patógenos, mas também os mecanismos de remoção devem ser os mesmos ou muito semelhantes para ambos ao longo do processo de potabilização.

No geral, as bactérias e alguns vírus são inativados por desinfecção, enquanto que cistos e oocistos de protozoários são removidos principalmente por processos de separação: a sedimentação ou decantação e a filtração. Deve-se considerar ainda a resistência aos desinfetantes das bactérias indicadoras e dos microrganismos patogênicos: ovos de helmintos são mais resistentes que cistos e oocistos de protozoários que são mais resistentes que os vírus que são mais resistentes que as bactérias.

Portanto, os coliformes são indicadores limitados: indicam a eficiência de inativação de bactérias patogênicas e em especial de enterobactérias, mas não de vírus, protozoários

e helmintos. Para protozoários, devem-se isolar, identificar e quantificar, se for necessário, cistos e oocistos de referência: os cistos de *Giardia lamblia* e os oocistos de *Cryptosporidium spp.* Estas técnicas, bastante frequentes em laboratórios dos Estados Unidos e da Europa, são complexas, utilizam equipamentos de alto custo e não são práticas para uso na rotina do laboratório de análises de água. Além disso, não são de fácil acesso para as companhias de tratamento de água de numerosos países, entre eles, aqueles em desenvolvimento. Para contornar esses inconvenientes, foram escolhidos indicadores complementares não biológicos e que são medidos em todas as estações de tratamento de água: são os mesmos parâmetros de controle da desinfecção (tempo de contato x cloro residual) e a turbidez (BASTOS et al., 2001; BASTOS; BEZERRA; BEVILACQUA, 2007).

As limitações citadas dos coliformes como indicadores universais de contaminação fecal são amplamente reconhecidas pela USEPA e a OMS. Mas para fins práticos, as normas da USEPA (2004) e as diretrizes da Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 2004) – mantêm o padrão microbiológico de ausência de coliformes na água potável. A OMS faz menção especial à ausência de *Escherichia coli* na água tratada.

Referências

APHA, AWWA, WPCF. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater*. E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, L. S. Clesceri (Eds.). 22th ed. Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

BASTOS, R. K. X.; BEZERRA, N. R.; BEVILACQUA, P. D. Planos de segurança da água: novos paradigmas em controle de qualidade da água para consumo humano em nítida consonância com a legislação brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, v.24, 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2007. CD-ROM.

BASTOS, R. K. X. et al. Revisão da Portaria 36 GM/90: premissas e princípios norteadores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2001. CD-ROM.

BONILLA, T. D. N. et al. Species assemblages of Enterococcus indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. **Journal Marine Pollution Bulletin**, Florida, 2007, v.52, p.800-815.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras.* **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001, n. 18, Seção I, p.70-71, 25 jan.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de 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**, Brasília, 2005a, n. 53, p.58-63, 18 mar.

_____. Ministério da Saúde. Resolução ANVISA RDC Nº. 274, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para águas engarrafadas e gelo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/76f8a4804745865c8f88df3fbc4c>

6735/RDC_275_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 jun. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu

padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.

_____. *Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de Água*. 4. ed. Brasília: FUNASA, 2013, 150p.

CRAUN, G. F.; CASTRO, R. **La calidad del agua en América Latina. Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los subproductos de la desinfección química**. ILSI/OPS/OMS. Washington DC: IlsiPress, 1996.

FEACHEM, R. G. *Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: promotion of personal and domestic hygiene*. **Bull World Health Organ**, 1984, n.62, p.467-76.

GARCIA, D. G. M.; CEBALLOS, B. S. O. **Histórias (e Estórias) passadas e presentes de epidemias de cólera: Campina Grande no contexto paraibano**. Campina Grande: Editora Universitária da UFPB, 1998. 97p.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. C. *Cryptosporidium spp no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico*. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v.8, n.3, 2003.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E. et al. *A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through the public water supply*. **New England Journal of Medicine**, 1994, v.331, n.3, p.161-167.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK; D. P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de *Brock Biology of Microorganisms*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

PINTO, A. B.; OLIVEIRA A. J. F. C. *Diversidade de microrganismos indicadores utilizados na avaliação da contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas: estado atual do conhecimento e perspectivas*. **O mundo da saúde**, São Paulo, 2011, v.35, n.1, p.105-114.

SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. A comparison between wastewater treatment processes in terms of compliance with effluent quality standards. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL 27. 2000. Porto Alegre. **Anais...**, Rio de Janeiro: ABES, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2008, 760 p.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking water standards and health advisories**. Washington, DC: USEPA, 2004. (USEPA-R-04-005).

WHO. World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 2. ed. Geneva: WHO, 2004. 515p.

CAPÍTULO 4

Introdução às práticas de Microbiologia Sanitária e Ambiental

No laboratório de microbiologia sanitária e ambiental, realizam-se análises da qualidade da água, dos esgotos, lodos e solo entre outros materiais ou matrizes ambientais para a avaliação da contaminação fecal utilizando microrganismos indicadores específicos, como as bacterias coliformes (Coliformes Totais - CT, Coliformes Termotolerantes e E. Coli), enterococos, bacterias heterotróficas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp e *Clostridium perfringens*, entre outras bacterias. São também analisados fungos (bolores e leveduras), protozoários e mais recentemente algas e cianobacterias, causadores de cor, sabor e odor nas águas. Identificam-se e quantificam-se as toxinas de cianobacterias que afetam a biota aquática, animais e ao homem causando desde intoxicações leves a severas, tumores e até a morte (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Os resultados produzidos são informações preciosas que geram séries temporais e espaciais de dados (ou bancos de dados) sobre a qualidade das águas naturais e das potabilizadas, dos esgotos municipais brutos e tratados, e do impacto destes quando descarregados em um corpo receptor, entre outras situações. Esses dados são essenciais para definir políticas públicas e ações de gestão dos recursos naturais.

No laboratório de microbiologia, a qualidade dos profissionais que executam as análises, assim, como o interesse e os esforços dos alunos que realizam seus trabalhos práticos são imprescindíveis para a obtenção de resultados confiáveis.

Para um bom trabalho laboratorial, devem ser seguidas as normas de assepsia nas áreas de trabalho, ter cuidados estritos na preparação dos materiais a serem usados e empregar produtos de qualidade reconhecida para garantir resultados sem interferências externas.

Este capítulo inclui os materiais necessários ao laboratório de microbiologia, a conduta e as medidas de segurança a serem adotados, cuidados no preparo e esterilização dos meios de cultura e manutenção, padrões de trabalho em condições de assepsia e uso e conservação do microscópio, entre outros.

1. Material necessário ao laboratório de microbiologia

- a. Autoclave – para esterilização do material;
- b. Estufa bacteriológica para incubação das culturas;
- c. Estufa de esterilização e secagem;
- d. Balança de precisão;
- e. Destilador de água/Sistema de purificação de água ultrapura;
- f. Banho-maria com regulador de temperatura;
- g. Contador de colônias;
- h. Alça e agulhas de platina, com cabo de Kolle, alças de plástico atóxico estéreis e descartáveis;
- i. Tubo de Durhan ou similar para coletar o gás produzido na fermentação dos açúcares;
- j. Tubos de ensaio, recomendamos tamanhos 12x75 mm, 16x150mm, 20x160mm e 20x180mm;
- k. Algodão hidrofóbico de boa qualidade;

- l. Meios de cultura;
- m. Recipientes de coleta - frascos de coleta de vidro ou plástico autoclaváveis, bolsas plásticas atóxicas descartáveis, outros que possam ser esterilizados;
- n. Pipetas graduadas – de 1 mL, 5 mL e 10 mL e pipetas automáticas;
- o. Papel-alumínio;
- p. Bico de Bunsen/ câmara de fluxo vertical para trabalhar sob condições assépticas;
- q. Placas de Petri de vidro: Ø 100x15 mm ou Ø 100x20 mm, Ø 60x15 mm;
- r. Placas de Petri de plásticos estéreis e descartáveis Ø 47x10mm, Ø 60x15mm, Ø 90x15;
- s. Pinça de aço inox de pontas lisas não cortantes;
- t. Membranas filtrantes de poros de Ø 0,45µm e Ø 0,22 µm (detalhes no capítulo 10)
- u. Porta-filtro de plástico, de vidro ou de aço inox (detalhes no capítulo 10);
- v. Lâmpada de UV - lâmpada ultravioleta.

2. Condições de Assepsia nos Trabalhos do Laboratório de Microbiologia

Praticamente, em todos os ambientes, estão presentes microrganismos sejam patogênicos ou não patogênicos. Ar, solo e água são suas vias de transporte. O corpo humano também carrega microrganismos comensais, oportunistas e até patogênicos se a pessoa estiver com alguma infecção nos dentes, na pele ou no intestino, por exemplo, mãos sujas transmitem microrganismos àqueles que se deu a mão.

A manipulação incorreta dos instrumentos no laboratório de microbiologia, das culturas e de qualquer um dos materiais utilizados em uma análise, cria condições que

predispõem a sua contaminação por microrganismos e a perda da amostra e até de todo um experimento. Os procedimentos devem ser conhecidos pelos técnicos para a manipulação segura dos meios de cultura, das culturas bacterianas em crescimento e durante seu manuseio, para os repiques e as contagens, por exemplo, e para evitar qualquer contaminação com os microrganismos do ar das culturas e dos materiais em uso que na sua maioria foram previamente esterilizados. É também importante não contaminar o ambiente de trabalho com os microrganismos que estão sendo cultivados, quantificados, etc.

Por essas razões, no laboratório de microbiologia, mantêm-se cuidados extremos e trabalha-se sob condições assépticas ou de assepsia. Esse procedimento (ou conjunto de procedimentos) se denomina técnica asséptica.

3. Conduta no Laboratório de Microbiologia - Normas de Segurança

- a. Antes de entrar no laboratório, chefes, professores, técnicos e estudantes devem estar usando seus jalecos limpos e bem abotoados;
- b. Não entrar com pastas, mochilas e livros que não sejam necessários;
- c. Não deixar os cadernos de apontamento na bancada de trabalho ocupando lugar, pois podem contaminar e serem contaminados;
- d. Geladeiras, estufas e micro-ondas do laboratório não são adequados para conservar ou aquecer alimentos a serem consumidos pelos usuários. Podem estar contaminados ou podem contaminá-los;

- e. Não é correto comer no laboratório, pelas mesmas causas relatadas no subitem d. Não é correto fumar no laboratório;
- f. As bancadas de trabalho devem ser fáceis de limpar e de desinfetar (superfícies lisas);
- g. Iniciar e concluir cada experimento ou aula prática limpando e desinfetando a bancada de trabalho, preferencialmente com hipoclorito de sódio 2,5% ou álcool 70% que são eficientes e econômicos, ou com outros desinfetantes de efeito reconhecido;
- h. Organizar a área de trabalho com os materiais que serão utilizados (canetas marcadoras para escrever superfícies de vidro; agulhas; alças; tubos; etc.);
- i. Etiquetar com as informações necessárias todos os tubos, frascos e placas de Petri, entre outros materiais que serão usados. Preferir as etiquetas autoadesivas. Para materiais que serão autoclavados, recomenda-se usar fita autoadesiva especial, que muda de cor com o vapor e a temperatura e indica que o material foi esterilizado. Nessa fita, podem ser feitas anotações com lápis grafite para que não se apaguem no processo de autoclavagem;
- j. Caso exista alguma dúvida sobre a técnica a ser usada, deixar próximo ao local de trabalho o manual técnico correspondente;
- k. Antes de ligar o gás do bico de Bunsen, deixar sua área de influência livre. Tomar cuidados de que substâncias inflamáveis não fiquem próximas;
- l. A manipulação de material tóxico requer o uso de luvas;
- m. Pipetas usadas e contaminadas devem ser mergulhadas em desinfetante imediatamente após o uso,

- preferencialmente em posição horizontal, e antes de sua lavagem e esterilização;
- n. Não depositar instrumentos contaminados sobre a bancada, estes devem ser previamente esterilizados (alças, agulhas) por calor seco ou colocados em recipientes apropriados e esterilizados em autoclave;
 - o. Manipular com cuidado culturas de fungos: seus esporos são leves e representam riscos de reações alérgicas e de infecção respiratória. As placas com culturas não devem ser cheiradas pelas mesmas razões;
 - p. Lâminas e laminulas usadas devem ser mergulhadas em desinfetante; lavadas e secas para uso posterior;
 - q. Pingos de cultura na bancada: avisar ao responsável pelo laboratório e proceder rapidamente à limpeza do local com papel toalha embebido em desinfetante. Deixar o desinfetante agir por 15 a 30 minutos;
 - r. Contaminação de mãos, boca e olhos: avisar ao responsável pelo laboratório e proceder à lavagem da boca e olhos com abundante água; lavar as mãos com muita água e sabão e passar desinfetante;
 - s. Finalizado o trabalho, esterilizar e lavar todo o material usado, guardar os que estão limpos e lavar as mãos com cuidado, procedendo à sua desinfecção posterior, antes de sair.

Todos os procedimentos devem ser realizados sob condições de assepsia e seguindo a sequência dos passos metodológicos da técnica asséptica, citados a seguir.

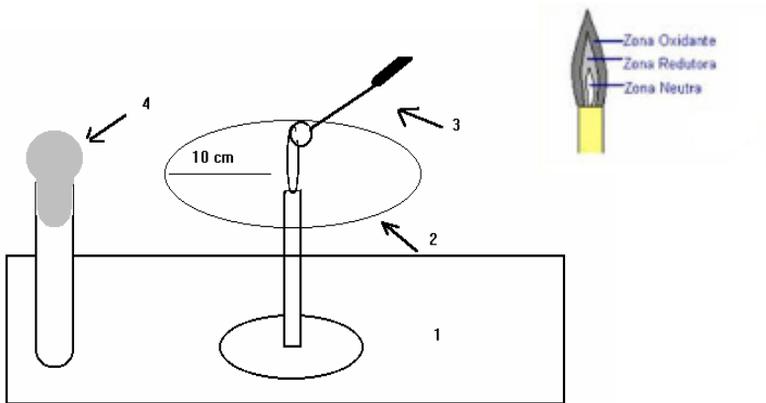
4. Metodologia da técnica asséptica

O comportamento no laboratório de microbiologia será sempre o mesmo, independente do tipo de microrganismo sob análise (vírus, bactéria ou protozoário) e de ser ou não patogênico.

- a. Lavar as mãos com água e sabão, enxugar e passar álcool 70%. Proceder à antissepsia das mãos sempre antes e depois de cada análise, mas também sempre que seja necessário por alguma presumível contaminação (as unhas devem estar curtas e os cabelos devem ser amarrados e protegidos com uma touca descartável);
- b. Limpar a área de trabalho com água e sabão. Depois de seca, sanitizar com antisséptico a bancada - usar de preferência água sanitária (hipoclorito de sódio 2,5%) ou álcool 70%. Toda a bancada do laboratório deve estar sempre limpa e ser sanitizada pelo menos duas vezes por dia, ainda que não seja utilizada em toda sua extensão. O laboratório (armários e prateleiras, pisos e azulejos) deve ser limpo cuidadosamente todos os dias, para não acumular poeiras. Recomenda-se limpar os pisos pelo menos duas vezes por dia com água e sabão e, posteriormente, passar um pano com desinfetante. O melhor desinfetante e o mais econômico para pisos é o hipoclorito de sódio a 2,5%, também utilizado em bancadas;
- c. Uso do bico de Bunsen: para trabalhar com segurança na área estéril criada pelo calor da chama do bico de Bunsen, devem ser executados todos os movimentos na proximidade da chama (na zona de cor azul, oxidante). Essa área de segurança tem um raio aproximado de 10 cm em volta da chama do bico

de Bunsen. Na Figura 1, mostra-se o ambiente de esterilidade gerado pelo calor e as zonas da chama;

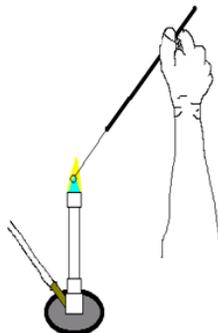
Figura 1 - Ambiente de esterilidade gerado pelo calor e as zonas da chama: 1) área de trabalho; 2) área estéril pelo calor; 3) posição da alça bacteriológica para esterilização por calor seco; 4) distância máxima entre o tubo de ensaio com a cultura e a chama.



Fonte: Cerqueira e Sant'Anna (2007).

- d. Esterilizar adequadamente alças e agulhas de inoculação de platina ou material similar antes e depois do seu uso, na chama do bico de Bunsen (Figura 2). Nesse procedimento, deve-se evitar a formação de aerossóis, o que ocorre quando fica retido material na ponta da agulha ou no interior da alça. Consegue-se eliminar o resíduo orgânico aquecendo desde a base até ponta. Para as alças e agulhas de plástico, procede-se o seu descarte em recipiente com desinfetante;

Figura 2 - Esterilização da alça (destaque para a zona azul da chama)



Fonte: Cerqueira e Sant'Anna (2007).

- e. Flambar a boca dos frascos e dos tubos de ensaio antes e depois de uso. Evitar superaquecimento dos materiais de vidro, o qual pode causar sua fratura.

Para a inoculação segura de uma placa de Petri, seja com alça bacteriológica ou de Drigalski, o procedimento deve ser feito na área de segurança do bico de Bunsen aceso. Contaminações com microrganismos do ar são frequentes, ao flambar a boca dos frascos e dos tubos, cria-se uma área quente ao redor que evita a entrada dos microrganismos. O mesmo ocorre ao se inocular as placas de Petri na área de calor.

A câmara de fluxo laminar é um equipamento projetado para gerar um ambiente de trabalho estéril para a manipulação segura e confortável de materiais que devem manter sua esterilidade, evitando as contaminações com microrganismos do ambiente. O ar que circula verticalmente é esterilizado após cada passagem através de filtros que retêm mais de 99,97% de partículas menores de $3\mu\text{m}$.

A câmara de fluxo laminar protege as culturas e os materiais estéreis e impede a contaminação do técnico, facilitando

o trabalho sob condições assépticas, tornando-se mais segura que o bico de Bunsen.

5. Preparação, Desinfecção, Sanitização e Esterilização do Material para as Análises Microbiológicas

A eliminação ou a redução de microrganismos é de importância fundamental em diversas situações e em materiais, como equipamentos cirúrgicos e procedimentos médicos, na área da indústria de alimentos e em superfícies vivas como a pele.

O crescimento microbiano pode ser controlado por procedimentos diferentes e com uso de diversas técnicas às vezes combinadas, que podem ser de natureza física ou química que reduzam a quantidade de microrganismos, ou os eliminem ou impeçam sua reprodução.

No controle de microrganismos, os procedimentos se classificam em pelos menos 5 classes:

- a. Desinfecção: propicia a redução do número dos microrganismos em superfícies inanimadas (ambiente ou materiais) e em consequência ocorre eliminação ou diminuição da potencialidade infecciosa;
- b. Sanitização: é o termo aplicado à desinfecção na indústria de alimentos;
- c. Antissepsia: define a redução do número de microrganismos em tecidos vivos;
- d. Esterilização: refere-se à destruição completa dos microrganismos em qualquer ambiente ou em materiais;
- e. Assepsia: refere-se à ausência de microrganismos em um ambiente ou em um material. As técnicas assépticas se referem a cuidados sistemáticos que previnem a contaminação.

6. Agentes Físicos para o Controle da População Microbiana

- a. **Baixas temperaturas:** refrigeração, congelamento e liofilização de alimentos:
- **Refrigeração:** temperatura mantida entre 0°C e 5°C (variação de $\pm 2^\circ\text{C}$), não destrói os microrganismos mesofílicos, mas inibe sua proliferação;
 - **Congelamento:** temperatura de -18°C elimina ou inibe o crescimento das bactérias;
 - **Liofilização de alimentos:** água removida por alto vácuo em baixa temperatura.
- b. **Altas temperaturas: uso do calor** - fator físico de amplo uso por ser econômico, de fácil acesso e eficaz. Pode ser utilizado na forma de **calor seco**, para esterilizar alças, agulhas, instrumento de vidro ou de metal, etc., ou **calor úmido**, obtido pela produção de vapor de água;
- Calor seco:** queima a matéria orgânica, oxidando-a. As formas de uso do calor seco são:
- **Flambagem:** esteriliza pela queima do material contaminante pelo seu contato direto com o fogo;
 - **Estufa:** esteriliza as temperaturas de 170 a 180°C durante um tempo de 1 a 2 horas. É usado para esterilizar material de metal (instrumentos de cirurgia) e de vidro, que devem ser embrulhados ou colocados dentro de caixas metálicas (porta-pipetas de inox, por exemplo) antes do tratamento;
 - **Incineração:** é a queima direta e total do material orgânico. É usado para materiais de hospitais.
- Calor úmido:** o calor úmido desnatura as proteínas, causando a inativação das enzimas seguida da morte

celular. Geram-se temperaturas desde < 100°C até > de 100°C. As tecnologias que aplicam calor úmido são:

- **Pasteurização:** é um método de desinfecção que se usa principalmente para patógenos de alimentos. São pasteurizados leites, sucos, queijos, entre outros. A pasteurização do leite é geralmente feita pelo aquecimento rápido até 72°C, mantida durante 15 a 20 segundos, e se resfria rapidamente. O processo reduz em mais de 99% os microrganismos do leite, mas não os esporulados;
 - **Fervura:** ocorre a 100°C, em geral se aplica durante 15 minutos e tem efeito desinfetante. Destroi bactérias, nas formas vegetativas, mas não todos os esporos;
 - **Autoclavação:** a esterilização em autoclave usa o calor úmido sob pressão, o que permite atingir temperaturas superiores a 100°C. O calor úmido tem maior eficiência na destruição de formas vivas, devido à água ser um condutor de calor mais eficiente do que o ar. No geral, para destruir bactérias e seus esporos, aplicam-se pressões de 1,5 atmosferas durante 20 a 30 minutos, o que significa temperaturas de 121°C na forma de vapor, agindo esse tempo sobre formas vivas. A essa temperatura e pressão, o vapor possui alta capacidade de penetração nas células e nos tecidos.
- c. **Luz Ultravioleta não ionizante:** tem máxima atividade desinfetante em λ de 260nm, é usada para ambientes e também para alguns instrumentos. Não tem capacidade de penetração e age apenas na superfície. A

ação sobre os microrganismos ocorre por alterações no DNA;

- d. **Filtração:** é um método clarificante com função desinfetante quando se usam membranas que retêm as impurezas mais grossas que causam turbidez. Membranas de poros menores, na ordem dos μm (0,22 a 0,1 μm e menores), podem reter vírus e têm função esterilizante;
- e. **Pressão Osmótica:** ambientes salgados causam a desidratação ou dessecação das bactérias. Usa-se como salga nos alimentos (carne de sol, charque, peixes, etc.).

7. Agentes Químicos para o Controle da População Microbiana

- a. **Álcool etílico:** com vários mecanismos de ação, é um eficiente solvente de lipídios agindo como detergente e tem capacidade desidratante desnaturando proteínas. Age como desinfetante ou antisséptico. Álcool a 70% tem maior capacidade de penetração e de desidratação celular;
- b. **Cloro/lodo (Halogênios):** o cloro gasoso ou como hipoclorito de sódio (água sanitária) é um potente desinfetante que age oxidando a matéria orgânica e destrói as membranas. O Ácido hipocloroso é altamente instável e espontaneamente forma ácido clorídrico (HCl) e oxigênio que matam os microrganismos. O lodo combina-se com os aminoácidos fenilalanina e tirosina das proteínas de forma irreversível e causa sua desnaturação. Tem poder antisséptico e é mais utilizado na prática cirúrgica.
- c. **Detergentes e sais de metais pesados:** Sulfato de Cobre - CuSO_4 e Nitrato de Prata (AgNO_3), Mercúrio (Hg).

8. Autoclave e Autoclavação

A autoclavação é a técnica mais usada no laboratório de microbiologia para esterilizar diversos materiais, é recomendada preferencialmente pela ANVISA. Permite a destruição de formas vegetativas de bactérias e de seus esporos.

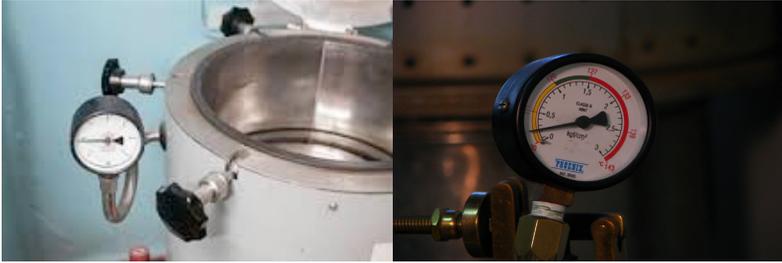
A autoclave é formada por uma estrutura externa cilíndrica ou retangular de metal resistente em posição vertical ou horizontal em cuja base está a resistência que aquecerá a água. No interior, possui outro cilindro de diâmetro menor com base furada para permitir a passagem do vapor de água. Ali se colocam os cestos (um ou dois, segundo o tamanho da autoclave), onde se organizará o material a ser esterilizado. Na parte superior, possui a tampa que se fecha hermeticamente com auxílio de parafusos. Em cima da tampa, estão as válvulas de segurança e de saída do ar, chave de controle da temperatura, e um manômetro que indica a pressão interna com escala de conversão para temperatura em graus centígrados (Figuras 3 e 4):

Figura 3 – Autoclave vertical



Fonte: SP Labor (2015).

Figura 4 - Detalhes do manômetro e parafusos



Fonte: SP Labor (2015).

Antes de colocar os materiais dentro da autoclave para serem esterilizados, estes devem ser preparados.

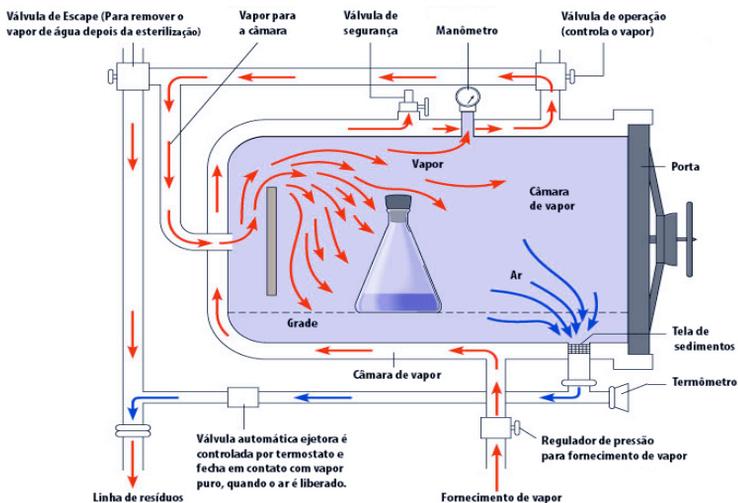
- a. Todo o material deve estar perfeitamente limpo (lavado com sabão ou detergente neutro, enxaguado muito bem com água destilada e secado).
- b. Alguns desses materiais (placas de Petri, espátulas, pipetas) devem ser embrulhados em papel tipo Kraft ou em papel manteiga e amarrados com linha ou com fita adesiva apropriada para suportar o calor úmido. Essa preparação pode ser substituída por caixas de materiais passíveis de serem autoclavados (inox, alumínio) com tampas.
- c. As tampas de frascos com meios de cultura, soluções e líquidos, em geral, não devem ser totalmente fechadas para facilitar a passagem do vapor de água quente no interior do líquido. Para os tubos de ensaio e erlenmeyers, em geral, são utilizadas rolhas de algodão hidrofóbico forrado com gaze. Essa rolha ou tampão não permite a entrada de microrganismos, mas sim do vapor de água quente dentro dos frascos e dos tubos que esteriliza o líquido. Recomenda-se o uso de fita autoadesiva

indicadora que muda de cor com o vapor quente e evidencia o estado de esterilidade desse material, e se o pacote não for aberto ou rasgado o papel, o objeto mantém sua esterilidade durante meses e pode ser guardado para uso posterior. No mercado, existem embalagens de feche hermético ou por calor, para esterilizar tesouras, espátulas, agulhas e pinças, entre outros, feitos de materiais que permitem a entrada do vapor de água e que são importantes para manter o material estéril depois de retirado da autoclave. Facilitam manter a organização dos instrumentos a serem utilizados em cada procedimento e, de forma semelhante à fita autocolante, deixam em evidência que o pacote foi esterilizado, sendo facilmente visualizado no controle da vigilância sanitária. Há diferentes tipos de embalagens para esterilização em autoclave, o mais comum é o conjunto papel grau cirúrgico – filme plástico, denominado papel grau cirúrgico (Figura 6).

- d. Verificar o nível da água dentro da autoclave e completar com água destilada até cobrir a resistência. A água destilada evita incrustações de sais na resistência que necessitam ser retiradas para que esta não passe por superaquecimento. Águas duras possuem elevados teores de carbonato de cálcio que se depositam na resistência e podem danificá-la.
- e. Colocar o material dentro do cesto, tampar e ajustar os parafusos.
- f. Ligar a autoclave com a válvula de ar aberta. Esperar a fervura da água e a saída de um jato de vapor contínuo pela válvula que retira o ar residual de dentro da autoclave. Após alguns minutos, fechar essa válvula

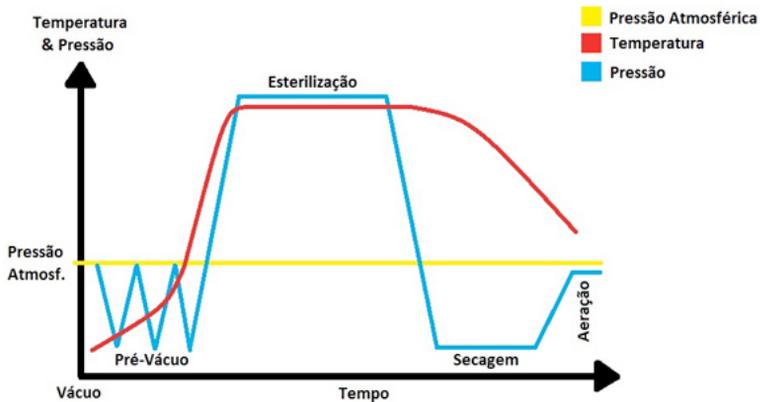
para deixar subir a pressão interna. O ar interno deve ser retirado para que todo o volume da autoclave seja preenchido pelo vapor de água e este exerça a pressão lida no manômetro. Se houvesse mistura ar/vapor de água, ambos exerceriam pressão, e a temperatura dentro da autoclave não teria relação com a leitura no manômetro, porque ambos os gases possuem calor específico diferente. As Figuras 5 e 6 mostram a circulação do ar e do vapor na autoclave e a evolução da temperatura e pressão durante o processo de esterilização e resfriamento. Observa-se o pré-vácuo (retirada do ar interno) e o aumento posterior da temperatura seguido do período de esterilização que ocorre na máxima temperatura e durante curto tempo.

Figura 5 – Circulação do vapor na autoclave



Fonte: Blog Mcientifica (2014; Ponto Ciência (2015)).

Figura 6 - Ciclo típico de autoclavagem - Relação Tempo/Pressão e Temperatura



Fonte: Luqueta (2008).

- g. Esperar o manômetro marcar 1,1 atmosferas (121°C) e diminuir a temperatura. Começa, nesse momento, o processo de esterilização. Marcar a hora de início e controlar o tempo que pode ser entre 15 a 30 minutos, dependendo do tipo e quantidade de material. A autoclave gera vapor a alta pressão, atingindo 1,1kg por cm² e sob essas condições, o vapor de água atinge 121°C que em 15 minutos promove a esterilização. Ressalta-se que é o calor e não a pressão que mata os microrganismos e destrói os esporos. Vapor de água a 121°C durante 4 a 5 minutos promove a esterilização de aproximadamente 10 esporos de uma população de 100. Já células vegetativas de bactérias requerem 0,1 a 0,5 minutos a 65°C para obter o mesmo resultado (MADIGAN et al., 2010).
- h. Concluído o tempo de esterilização, desligar a autoclave, esperar que baixe a temperatura e abrir a

válvula de ar para eliminar o resto de vapor. Somente então se abre a autoclave. Retira-se o material que estará úmido e deixa-se no ambiente ou em estufa até secar.

Autoclaves modernas não exigem todos esses cuidados. Travam automaticamente a porta por pressão e possuem controle computadorizado de tempo e temperatura. Podem ser programadas ao final do expediente para esterilizar durante a noite, por exemplo, e, no dia seguinte, retirar o material já resfriado.

A autoclave deve ser controlada periodicamente de forma semelhante a todos os equipamentos do laboratório. Os itens para verificação sistemática, em geral, segundo Sousa (2013), são:

- a. Parâmetros de funcionamento: certificados de calibração, testes de hermeticidade, integridade dos medidores, válvulas, termóstato, entre outros.
- b. Distribuição de calor a vazio e com carga (garantia de homogeneidade do processo).
- c. Testes da letalidade do processo com controles físicos, químicos e biológicos têm a recomendação da ANVISA (SOUSA, 2013) de serem realizados uma vez por semana, com indicadores biológicos e usar em todos os ciclos os indicadores químicos.
- d. Treinamento de pessoal.
- e. Protocolo de liberação e uso.

Falhas na esterilização têm origens em problemas de funcionamento do equipamento ou em erros na técnica aplicada. Quando ocorrem falhas no processo, requer-se um exame minucioso em todos os componentes do aparelho. Os mais comuns e que possibilitam a ineficiência da esterilização são:

- f. Carga incorreta com materiais empilhados um sobre o outro.

- g. Ar dentro da autoclave que não foi eliminado antes de fechar a válvula de escape do vapor.
- h. Falhas no controle de tempo e temperatura são críticos na esterilização e devem ser bem controlados pelo operador em equipamentos não automáticos.
- i. Limpeza incorreta ou deficiente dos materiais.
- j. Utilização de invólucros inadequados para os materiais a serem esterilizados.
- k. Confecção de pacotes muito grandes, pesados ou apertados.
- l. Abertura muito rápida da porta ou tampa ao término da esterilização.
- m. Utilização de pacotes ainda úmidos recém-saídos da autoclave.
- n. Mistura de pacotes esterilizados e não esterilizados.
- o. Não identificação da data de esterilização e data-limite de validade nos pacotes.

9. Uso e conservação do Microscópio Óptico

A familiarização com o microscópio e com seu uso (microscópio óptico composto – binocular, ou microscópio óptico comum monocular e microscópio invertido) é fundamental para a obtenção de bons resultados e para não danificar o instrumento.

Constituição do Microscópio óptico composto (MOC)

O microscópio óptico composto (MOC) é constituído por duas partes principais: uma mecânica e outra óptica. A parte mecânica permite a estabilidade do equipamento e é o suporte da parte óptica.

A parte mecânica é constituída por:

- a. **Pé ou Base** – suporta o microscópio, assegura a sua estabilidade.
- b. **Braço ou Coluna** – peça fixa à base, na qual estão aplicadas todas as outras partes do microscópio.
- c. **Tubo ou Canhão** – cilindro que contém os sistemas de lentes: na extremidade superior, estão as lentes oculares, e na inferior, o revólver com as lentes objetivas.
- d. **Platina** – peça circular, quadrada ou retangular, paralela à base, onde se coloca a preparação a ser observada. Possui no centro um orifício circular ou alongado que permite a passagem dos raios de luz concentrados pelo condensador e que devem fazer foco no preparado.

A parte óptica mecânica é constituída por:

- a. **Parafuso Macrométrico** – engrenagem que está incluída no tubo, que suporta oculares na parte superior situados e os objetivos na parte inferior (situados no revólver) e permite sua movimentação (aproximação ou distanciamento da platina onde foi colocado o preparado a ser observado). É indispensável para focalizar a imagem, e permite movimentos grandes.
- b. **Parafuso Micrométrico** – também incluído no tubo, permite focalizar ou mover o tubo com as lentes com movimentos de amplitude muito reduzida, completando a focagem. Permite explorar a profundidade de campo do microscópio.
- c. **Revólver** – é um disco adaptado à zona inferior do tubo, que pode suportar quatro objetivas de diferentes aumentos (10x, 20x, 40 x e 100x) e, por rotação, possibilita trocar rapidamente a lente da objetiva que, como seu nome indica, é a lente que está diretamente acima do objeto (preparado na lâmina).

A parte óptica propriamente dita é constituída por:

- a. **Sistema de Oculares e Sistema de Objetivas** – o conjunto de lentes que permitem a ampliação do objeto. A ampliação dada ao microscópio é igual ao produto da ampliação da objetiva pela ampliação da ocular.
- b. **Fonte de Luz** – atualmente a iluminação é fornecida por uma lâmpada incluída na base do microscópio (iluminação artificial) de alta potência. Antigamente se usava luz natural – luz do sol que era captada e dirigida ao microscópio através de um espelho fixado na base que refletia a luz solar (iluminação natural).
- c. **Condensador** – distribui a luz no campo visual do microscópio.
- d. **Diafragma** – regula a intensidade luminosa no campo visual do microscópio. Devido a estes componentes serem de alta precisão e por ser o microscópio um instrumento de custo elevado, requer cuidados especiais de transporte, utilização e manutenção.

Para se efetuar a observação microscópica, o observador deverá estar sentado com a coluna reta.

- Se o MOC possuir uma ocular, deve-se olhar com o olho esquerdo, mantendo os dois olhos abertos. Se tiver duas oculares, deve-se olhar por ambas.
- Os parafusos de comando devem ser manuseados com a mão esquerda, deixando a mão direita livre para apontamentos e poder desenhar as observações.

Para focalizar a lâmina:

- Colocar a ocular com o aumento desejado.

- Conferir a distância entre as duas oculares e a distância entre os olhos do observador, e proceder ao seu ajuste.
- Ligar a lâmpada.
- Posicionar o condensador o mais próximo possível da platina.
- Verificar se o diafragma está completamente aberto.
- Colocar em foco a objetiva de menor aumento (10x).
- Posicionar a lâmina preparada para observação na platina e fixá-la com as presilhas.
- Observar o campo microscópico com o menor aumento (10x).
- Ajustar o foco utilizando o parafuso macrométrico.
- Para maior aumento, trocar as objetivas e ajustar o foco com o parafuso micrométrico.
- Para observar a lâmina fixada e corada com a objetiva de imersão, colocar uma gota de óleo de cedro ou equivalente sobre a área corada da lâmina.
- Girar o revólver colocando a objetiva de imersão (maior aumento 100x) em foco.
- Se for necessário um ajuste maior que o permitido pelo parafuso micrométrico, fazer o ajuste da seguinte forma:
 - Olhando pelo lado, descer o canhão (ou subir a mesa de platina) utilizando o parafuso macrométrico até que a lente da objetiva de imersão fique em contato com o óleo.
 - Não se recomenda focalizar a imagem com a objetiva de imersão olhando pela ocular e sim pelo lado de fora, porque é possível quebrar a lâmina.

- A seguir, observando pela ocular, girar o parafuso macrométrico lentamente, até conseguir focalizar de forma grosseira a preparação.
- Mover o parafuso micrométrico até conseguir a focalização ideal.
- Para mudar o campo de observação, mover a platina.

Cuidados com o Microscópio Óptico

- Deve-se transportar o microscópio pelo braço, com a mão direita, enquanto se suporta a base com a mão esquerda.
- Não se deve tocar no sistema óptico com os dedos.
- Deve ser colocado numa mesa ou bancada lisa, nivelado e afastado da borda.

Observação microscópica:

Material necessário

- a. Papel absorvente, para limpar as lentes antes e depois do uso.
- b. Lâminas e lamínulas.
- c. Óleo de imersão (cedro).
- d. Culturas dos microrganismos a serem observados.
- e. Corantes para preparação das lâminas fixadas e coloridas (corantes de Gram, entre outros).
- f. Preparação de lâminas com material fixado (descrito no item sobre coloração microbiana).
- g. Recipientes com detergente ou desinfetante para descartar as lâminas usadas.
- h. A preparação de lâminas com material fixado está descrita no item 10, a seguir.

10. Coloração para observação de capsulas e camadas de mucilagem

Em geral, para observar a cápsula de LPS ou camada de mucilagem é mais simples adicionar a um esfregaço uma gota de nanquim e cobrir com a lamínula. Observa-se a cápsula ou camada de mucilagem refringente sobre um fundo escuro.

As bactérias coram-se com os derivados de anilina (azul de metileno, fucsina, cristal violeta, etc.) que são corantes básicos e, nesse caso, são coloridos íons positivos (cátion) da célula bacteriana. Em geral, esses corantes aniônicos possuem afinidade pelo citoplasma dessas células. A afinidade se deve a que o citoplasma bacteriano apresenta carga elétrica negativa, devido aos radicais fosfatos dos ácidos nucleicos (DNA, RNA).

- **Coloração simples:** lugol, nanquim e fucsina.
- **Coloração Diferencial:** utilizam-se geralmente dois corantes, um mordente e um diferenciador. Baseia-se na diferença química existente entre as paredes das bactérias e conseqüentemente na reação diferente que as bactérias podem apresentar frente a um determinado corante. As colorações de Gram (1884) e de Ziehl-Neelsen (1882) são exemplos de coloração diferencial.

Passos a serem seguidos para a preparação de uma lâmina fixada e colorida.

1. Preparação do Esfregaço e Fixação da Amostra para Coloração:

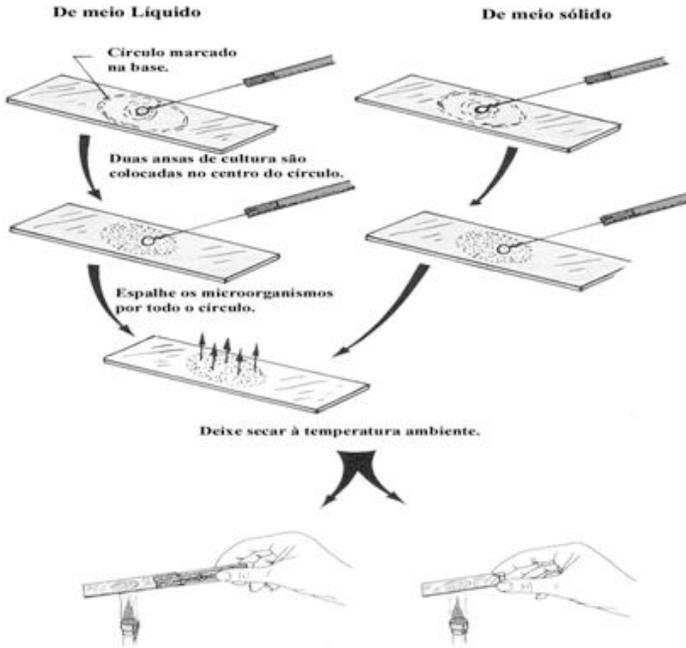
- a. Marcar com lápis para vidro o lado da lâmina onde será realizado.
- b. Colocar sobre ela o material com os microrganismos, que podem ser provenientes de água, solo, alimentos,

medicamentos, lesão, sangue, urina, líquido, fezes, escarro, secreção uretral, etc.

- c. No caso do material obtido de meio de cultura sólido ou de outro que contenha microrganismos em excesso, deve-se diluí-lo com uma gota de água destilada ou solução salina estéril (colocada anteriormente sobre a lâmina com auxílio de uma alça de platina estéril) até obter-se uma leve opalescência. Espalhar com movimentos circulares até formar uma fina camada sobre a lâmina.
- d. Deixar a lâmina secar ao ar, em repouso.
- e. Após seca, a lâmina deverá ser fixada, antes da coloração.
- f. A fixação evita que as células dos microrganismos sejam lavadas e perdidas durante o processo de coloração. A fixação permite a aderência das células à lâmina e mata os microrganismos por secagem e coagulação de seus protoplasmas, preservando suas estruturas na forma e posição originais. O calor é o método de fixação mais utilizado. Para fixar, passa-se a lâmina depois de seca ao ar com o esfregaço voltado para cima, por três vezes através da chama. Deve-se evitar o superaquecimento, testando depois de cada passada a temperatura da lâmina no dorso da mão.

A Figura 7 mostra, passo a passo, o procedimento para preparação do esfregaço e fixação.

Figura 7 - Procedimento para preparação do esfregaço e fixação



Fonte: Cerqueira e Sant'Anna (2007).

Coloração de Gram: é o método de coloração mais empregado em bacteriologia. Sua importância reside em separar as bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas (G^+) e Gram negativas (G^-). Essa diferença se baseia na distinta composição química das paredes celulares dos dois grupos de bactérias. A diferenciação através da coloração de Gram tem importância taxonômica, e é o primeiro passo para a identificação, classificação e definição da nomenclatura. Possibilita o diagnóstico presuntivo (preliminar) em casos de infecções graves e de sua evolução quando o médico necessita introduzir antibióticos ou quimioterapia antes da identificação confirmada do microrganismo causador da infecção.

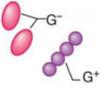
Corantes usados:

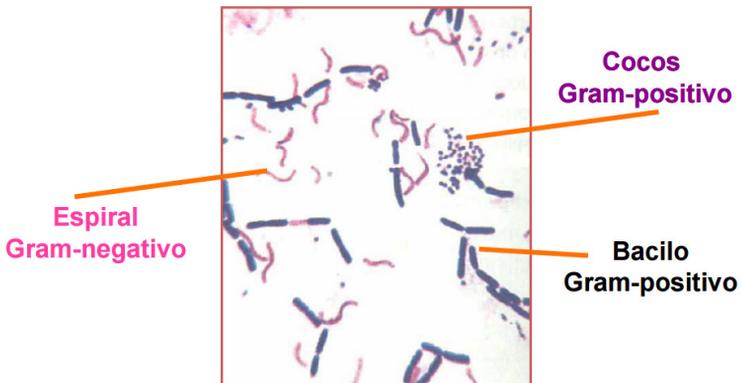
1. Cristal violeta é o corante principal (cora todas as bactérias na cor roxa).
2. Lugol (solução de iodo-iodeto de potássio) que age como mordente e que tem a finalidade de fixar o corante na célula, corando-a mais intensamente.
3. Álcool etílico: age na dissolução dos lipídios das paredes das bactérias Gram negativas ricas em lipídeos complexos.
4. Fucsina ou safranina: agem como corantes de contraste ou contracorantes. É o corante que dar às células descoradas a cor rosa intensa.

A Figura 10 apresenta os passos a serem seguidos na coloração de Gram (MADIGAN et al., 2010).

Figura 8 – Coloração de Gram. Bastonetes cor de rosa Gram negativos e cocos e bastonetes roxos Gram positivos

Coloração de Gram

- 1ª Etapa**  Cobrir o esfregaço fixado pelo calor com cristal violeta, por 1 min.
Resultado:
Todas as células coradas em roxo.
- 2ª Etapa**  Adicionar a solução de iodo por 3 min.
Resultado:
Todas as células permanecem roxas.
- 3ª Etapa**  Descorar rapidamente com álcool por aproximadamente 20 s.
Resultado:
As células gram-positivas coram-se em roxo; as gram-negativas apresentam-se incolores.
- 4ª Etapa**  Contracorar com safranina por 1-2 min.
Resultado:
As células gram-positivas (G+) coram-se em roxo; as células gram-negativas (G-) são róseas ou vermelhas.



Fonte: Patologia... (2015).

Fundamentos da coloração de Gram

Os dois grupos de bactérias absorvem igualmente o cristal violeta, a seguir o lugol reage com o cristal violeta formando o complexo iodo-pararosanilina, que se fixa e cora a célula mais intensamente. Já a adição de álcool provoca respostas diferentes: as Gram positivas permanecem com a cor violeta ou roxa devido à elevada concentração de peptidoglicano na sua parede celular e de outros componentes (ácidos teicoicos, proteínas, polissacarídeos) não solúveis em álcool.

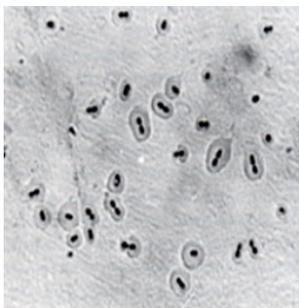
O álcool atua desidratando a parede Gram positiva e, em consequência, ocorre a diminuição da porosidade dessa parede que reduz a sua permeabilidade e diminui a porosidade, dificultando a saída do complexo violeta de genciana-lugol, localizado no citoplasma da célula. Também ocorre a retenção do complexo violeta-lugol na parede após a ação do álcool, contribuindo para a diminuição de sua porosidade. A bactéria Gram-positiva permanece com a mesma coloração roxa.

As bactérias Gram-negativas são descoradas pelo tratamento com o álcool, o qual se deve à composição rica em lipídios (lipoproteína, fosfolipídios da membrana externa e lipídio “A” nas moléculas de LPS) das paredes destas bactérias, que possuem também uma delgada camada de peptidoglicano. O álcool solubiliza os lipídios aumentando a porosidade da parede, o que contribui para o aumento da permeabilidade. O álcool penetra dentro da célula atravessando a membrana citoplasmática, remove o complexo violeta de genciana-lipídio-lugol e a célula fica sem corante. Quando se adiciona a fucsina sobre o esfregaço, esse corante de contraste penetra e a célula “Gram negativa” fica de cor rosa intensa.

Os meios de cultura, as técnicas de isolamento e quantificação de microrganismos sob condições de assepsia são apresentados no Capítulo 5.

A Figura 9 mostra a fotografia de uma lâmina de microscopia com coloração de nanquim para visualização da cápsula de LPS ou camada de mucilagem de LPS ou camada de mucilagem:

Figura 9 - Visualização da cápsula de LPS ou camada de mucilagem em diplococos, com uso de nanquim



Fonte: Madigan et al. (2010).

Referências

BLOG Biossegurança. 2011. Disponível em:<<http://www.cristofoli.com/biosseguranca/wp-content/uploads/2011/04/materia-2604-caixas-estojos-e-cassetes.jpeg>>. Acesso em: 13 out. 2015.

BLOG Mcientifica. **Autoclave**. 2014. Disponível em:< <http://www.blog.mcientifica.com.br/autoclave-2/>>. Acesso em: 25 out. 2015.

CERQUEIRA, A.; SANT'ANNA, R. S. **Apostila de Aulas Práticas: Disciplina Bacteriologia**. Universidade Federal Fluminense/ Instituto Biomédico/Departamento de Biologia e Parasitologia, 2007, 80p.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management**. London: E and FN Spon, 1999, 416 p.

LUQUETA, G. R. **Esterilização por calor e a cinética de morte microbiana**. São Paulo, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160p.

PATOLOGIA Clínica & Saúde. **Coloração de Gram Passo a Passo**. Disponível em: <<http://omundodapatologiaclinica.blogspot.com.br/2013/12/tecnica-de-gram-passo-a-passo.html>>. Acesso em 12 nov. 2015.

PONTO Ciência. **Como funciona uma autoclave**. Disponível em: <<http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/bitstream/handle/mec/15228/Como%20funciona%20uma%20autoclave.pdf?sequence=2>>. Acesso em 20 nov. 2015.

SOUSA, J. H. **Aspectos técnicos e legais da esterilização por autoclave a vapor**. Disponível em: <file:///C:/Users/C%C3%A9lia/Downloads/joao_henrique_campos_de_souza_1.pdf>. Balneário Camboriú, 2013. Acesso em 12 out. 2015.

SP Labor. **Autoclave vertical**. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/equipamentos-laboratorio/autoclave.html>. Acesso em 18 nov. 2015.

CAPÍTULO 5

Técnicas de isolamento, quantificação e identificação das populações microbianas

Como todos os seres vivos, os microrganismos necessitam para seu desenvolvimento de nutrientes apropriados e de características ambientais físicas e químicas favoráveis. No laboratório, essas condições são fornecidas pelo meio de cultura e pelas condições da incubação. O meio de cultura possui os nutrientes, a salinidade e o pH adequados para cada microrganismo específico em concentrações apropriadas para seu crescimento que ocorre sob condições ideais de aeração, umidade e temperatura de incubação durante o tempo necessário.

Para quantificar um determinado microrganismo presente em uma amostra é necessário selecionar o mesmo e obter uma cultura pura. Entretanto nas matrizes ambientais, os microrganismos estão formando agregados de comunidades mistas ou biofilmes onde ocorre sintrofia metabólica, isto é, o produto do metabolismo de uma espécie é utilizado como substrato por outra que se encontra integrando o mesmo biofilme.

O processo de seleção e obtenção de uma cultura pura a partir de uma cultura mista denomina-se **isolamento** e se consegue por meio da semeadura da amostra em meios de cultura específicos.

As técnicas de quantificação de bactérias se baseiam na promoção seletiva do crescimento (isolamento) daquelas de interesse contidas numa alíquota da amostra para o qual se empregam meios de culturas sólidos ou líquidos que fornecem os nutrientes específicos para essas bactérias sob condições apropriadas e controladas de temperatura e tempo de incubação.

Condições de crescimento: são fornecidas pela composição do meio de cultura e pela incubação em estufa bacteriológica sob as condições adequadas de tempo e temperatura.

A incubação deve fornecer condições ótimas para cada tipo ou espécie de microrganismo, de temperatura, concentração de oxigênio dissolvido (se forem aeróbias, ou sua ausência se forem microrganismos anaeróbios) e tempo. Essas características são essenciais para completar o ambiente adequado para o desenvolvimento de cada tipo específico e diferenciado de microrganismo.

A estufa bacteriológica é o equipamento essencial na incubação e deve ser calibrada cuidadosamente, com verificação periódica do termóstato. O controle da temperatura interna deve ser feito diariamente ou até duas vezes por dia. Recomenda-se colocar o termômetro dentro da estufa, na estante do meio, dentro de um tubo de ensaio com água e esse tubo dentro de um Becker também com água. Dessa forma, a leitura corresponde a um valor mais aproximado do valor real da temperatura dentro dos tubos e placas de Petri. Já o termômetro que se introduz desde o teto da estufa e fica por dentro, na parte superior, até a metade do espaço acima da primeira prateleira, fornece a temperatura do ar dentro da estufa e até essa altura, sendo que o calor provém da resistência situada na base.

Existe atualmente, no mercado, uma ampla variedade de estufas bacteriológicas, com dispositivos automáticos de controle da temperatura e tempo de incubação, por exemplo. Os cuidados citados devem ser mantidos principalmente com as estufas mais antigas.

Meios de cultura: os meios de cultura são constituídos por uma mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas que proporcionam nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e sais minerais, entre outros) e fontes de energia, pH e salinidade adequados para o crescimento e multiplicação *in vitro* dos microrganismos.

São poucas as bactérias que não crescem em meios de cultura por serem parasitos intracelulares obrigatórios. Entre elas, estão o *Mycobacterium leprae*, o *Treponema palidum* e as riquetsias e clamídias. Para seu crescimento em laboratório, requerem culturas de células e ovos embrionados.

Todas as bactérias de interesse sanitário crescem bem em condições de laboratório em meios de cultura comuns.

As técnicas de cultivo, isolamento e contagem exigem a manipulação de amostras contaminadas, meios de culturas e material de vidro estéreis e equipamentos diversos. Todo o manejo deve evitar contaminações em qualquer uma das etapas do processamento da amostra. Para isso, devem ser seguidos cuidadosamente os procedimentos de assepsia citados no Capítulo 4.

Os meios de cultura são preparados industrialmente e são disponíveis no mercado desidratados, em pó. Preparam-se facilmente pela adição de água destilada ou ultrapura, dependendo das necessidades experimentais. Exigem controle do pH no momento de sua preparação, e a maioria deve ser esterilizada antes de uso.

Em relação a sua composição química, os meios de cultura são considerados naturais e artificiais e básicos e complexos.

1. **Meios de Cultura Naturais** – em geral, aplica-se esta denominação aos meios de cultura de origem vegetal (frutas, rodelas de batata), animal (ovos) ou os de industrialização simples (pão). Seu uso se remonta aos primórdios das técnicas de microbiologia. Fungos e bolores foram observados em frutas e em pão. Propiciam o crescimento de microrganismos decompositores heterótrofos de diferentes grupos (bolores, leveduras e bactérias, entre outros). A desvantagem é sua inespecificidade, o que facilita a contaminação das culturas.
Bastante usados até a primeira metade do século XIX, foram em geral abandonados gradualmente pela criação dos meios líquidos fáceis de esterilizar por fervura, como os utilizados por Louis Pasteur, entre outros (GEISON, 2014) e posteriormente pela produção de meios sólidos mais específicos (MADIGAN et al., 2010).
2. **Meios de Cultura Artificiais** – possuem substâncias químicas definidas ou não e, em geral, são denominados de meios complexos.

Quanto à sua consistência ou estado físico, os meios de cultura podem ser **líquidos**, **semissólidos** e **sólidos**, dependendo da ausência ou presença e concentração do ágar-ágar ou de outros agentes gelificantes.

Nos meios líquidos, os microrganismos, e, em particular, as bactérias, crescem dispersos no volume do meio, na superfície e próxima a esta se forem aeróbios, mais próximo do fundo se o metabolismo é anaeróbio ou em todo líquido se forem facultativos. Seu crescimento é visualizado pela turbidez do meio de cultura, pela mudança de sua cor e pela produção de gás, por exemplo.

O ágar (ágar-ágar) presente nos meios de cultura sólidos é um coloide obtido de algas marinhas vermelhas da classe Rodophyta, denominadas genericamente “algas agarófilas ou agarófitas”. Apresenta a propriedade de permanecer em estado líquido acima de 45°C e sólido a temperaturas inferiores, constituído por agarose e agarpectina, carboidratos estruturais da parede celular das algas citadas. O nome ágar-ágar provém do idioma malaio e significa gelatina, repetida duas vezes pela tradição nas culturas da Polinésia para dar ênfase à palavra, que significa então “pura gelatina”, e traduzido, “gelatina-gelatina” ou “pura gelatina”.

Nos meios solidificados pela adição de ágar-ágar, as bactérias crescem num lugar fixo, originando colônias fáceis de visualizar a olho nu e quando necessário, com auxílio de uma lupa. As colônias bacterianas podem ser definidas como massas visíveis de células originadas a partir de uma única célula (ou de uma única bactéria) ou de duas que estavam muito próximas ou de umas poucas mais, que ficaram pressas no ágar quando este solidificou a temperatura inferior de 45°C.

Meios de Cultura Líquidos: são os mais antigos e preparados pelos primeiros microbiologistas como caldos ricos em nutrientes provenientes da carne e ossos de animais; eram fervidos, filtrados e esterilizados. Hoje são preparados com ingredientes purificados como digerido péptico de tecido animal, extrato de carne, lactose, fatores de crescimento específicos como vitaminas, aminoácidos quando necessários e indicadores de pH. Não contêm ágar-ágar. São fornecidos na forma em pó e sem agentes solidificantes, quando adicionados de água são verdadeiros caldos. São utilizados para reativação de culturas microbianas com preferência para um substrato definido (caldo lactosado), para selecionar grupos específicos (Verde Brilhante Bilis 2%), para repiques de microrganismos

(caldo nutriente, BHI), e provas bioquímicas em geral, entre muitas outras aplicações.

Meios de Cultura Semissólido – a quantidade de ágar-ágar ou de um outro agente gelificante varia de 0,08 a 0,5%, e até 1%. Possuem consistência intermediária entre os líquidos e os sólidos e são usados para permitir o crescimento de microrganismos em tensões variadas de oxigênio, para a verificação da motilidade da cepa e também para a conservação de culturas bacterianas puras para uso posterior. Alguns autores denominam estes meios como Meios Estoque.

Meios de Cultura Sólidos – contêm ágar-ágar ou outros agentes solidificantes na concentração entre 1,5 a 2,0%. Permitem que as bactérias inoculadas fiquem presas no ágar e formem colônias visíveis a olho nu. Considerando que uma única célula de *E. coli* se multiplica a cada 30 minutos sob condições ótimas de crescimento; em 24 horas, uma colônia teria 2^{48} bactérias, ou seja, 282 trilhões de bactérias (conglomerados de bactérias).

Segundo sua fórmula química, os meios de cultura se classificam em três tipos:

- **Não seletivos:** também denominados meios de cultura simples, permitem o crescimento de numerosas bactérias, capazes de se desenvolverem com esses nutrientes e em pH e temperaturas determinadas.
- **Seletivos:** são meios de culturas que incluem ou excluem algum ingrediente que favorecem o crescimento de um microrganismo determinado (por exemplo, a ausência de compostos de nitrogênio permitirá o desenvolvimento de bactérias fixadoras de N_2). Meios seletivos são todos aqueles utilizados na confirmação bioquímica das bactérias.
- **De enriquecimento:** contêm substâncias específicas para um determinado microrganismo ou grupo de

microrganismos, o qual favorece o seu desenvolvimento seletivo sobre o resto da biota microbiana. Por exemplo, a incorporação de Na_2SO_4 , em um ambiente anaeróbio de cultivo, enriquece o crescimento das bactérias redutoras do sulfato que utilizam esse composto no seu metabolismo como acceptor final de elétrons. A presença de ferro gera condições preferenciais para bactérias oxidantes do ferro se for um ambiente aeróbio, e de forma idêntica, a presença de enxofre, entre muitos outros elementos. Para as bactérias de interesse médico de difícil crescimento (fastidiosas), adicionam-se gema de ovo, sangue, plasma, soro e leite.

A maioria dos meios de cultura seletivos facilita a identificação de bactérias ou de grupos de bactérias que ali se desenvolvem e causam mudança da cor, devido à alteração do pH e, às vezes, pela produção de gás, consequência do metabolismo bacteriano. São também indicadores específicos de um meio de cultura a precipitação de componentes do meio e a atividade proteolítica e lipolítica, como a atividade de digestão do ágar. Um exemplo de meio seletivo é o TSI. O meio TSI – Triple Sugar Iron (ágar de ferro com três açúcares) é usado para diferenciar bioquimicamente os bastonetes Gram negativos, pela fermentação de carboidratos, e a produção de sulfeto de hidrogênio. Para o uso correto do meio, este deve ser preparado e distribuído em tubos de ensaio pequenos, de 12x75 mm, e se deixam solidificar em posição inclinada de modo que fiquem, no tubo, uma base profunda e um ápice inclinado.

O meio contém três hidratos de carbono (glicose 1g, lactose 10g, e sacarose 10 g), hidrolisado pancreático de caseína 10,0 g, hidrolisado péptico de tecido animal 10,0g, sulfato de ferroso de amônio 0,2 g, cloreto de sódio 5,0 g, tiosulfato de

sódio 0,2 g, vermelho de fenol 0,025g e ágar 13,0g. Quando os açúcares são fermentados, a produção resultante de ácido é detectada pelo indicador presente no meio: o vermelho de fenol que é de cor vermelha em pH básico 7,3 + - 0,2 e muda para amarelo em pH inferior. A lactose e a sacarose estão presentes em concentrações muito mais elevadas do que a glicose no meio TSI, então, a formação ácida na base do tubo deve-se à fermentação mais acentuada desses dois açúcares, enquanto a formação ácida a partir da glicose é suprimida por uma oxidação rápida da pequena quantidade de ácido que é formado na área inclinada do tubo. Quando apenas a glicose é fermentada, ocorre uma reação de neutralização ou alcalinização do pH do meio que fica vermelho. A sacarose adicionada ao meio permite a exclusão de determinados organismos coliformes e *Proteus* que podem atacar a sacarose, mas não a lactose, num período de incubação de 24 a 48 h.

No pH neutro ou alcalino, o sulfeto de hidrogênio, produzido a partir do tiosulfato de sódio, reage com o sal ferroso de amônio, resultando na formação de sulfeto ferroso, de cor preta. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico do meio.

Os meios de cultura são adquiridos prontos e desidratados, e são preparados seguindo as indicações dos fabricantes. Na sua maioria, têm composição química definida: extrato de carne, leveduras, peptonas, sais e um indicador de pH, que muda de cor para condições ácidas e alcalinas, alguns contêm substâncias tamponadoras que evitam mudanças bruscas de pH.

Os Meios de Cultura Líquidos são distribuídos em tubos de ensaio e cobertos com tampa de metal ou tampão de algodão. Para detectar a produção de gás, coloca-se no interior do tubo um pequeno tubinho invertido (Tubo de Durham) e esteriliza-se o conjunto (Figura 1). Nos meios líquidos, é a turbidez do líquido que evidencia o crescimento. São bastante usados em técnicas de quantificação de bactérias e, em

especial, para coliformes (Técnica de Tubos Múltiplos), na rotina dos laboratórios das Estações de Tratamento de Água. Mas a técnica é aplicável para qualquer tipo de bactéria, utilizando-se os meios de culturas adequados para cada bactéria ou grupo, assim como as condições de temperatura e tempo de incubação.

Figura 1 – Tubos de ensaio com meios de cultura líquidos: Caldo Lactosado (amarelo) e Verde Brillhante BÍlis 2% (verde) para a quantificação de coliformes totais em amostras de água



Fonte: Microbiologia Didática (2015).

No interior dos tubos da Figura 1, visualizam-se os tubos de Durham, que coletam parte do gás produzido na fermentação da lactose nos dois meios de cultura (formação de bolha no tubo de Durham na figura do tubo isolado). A bÍlis 2% incluída no meio Verde Brillhante BÍlis seleciona as bactÍrias intestinais que são adaptadas à bÍlis secretada pela vesÍcula biliar.

Os meios de cultura com ágar são preparados e esterilizados em balões de vidro e, posteriormente, são distribuídos em placas de Petri estÍreis, onde se deixam solidificar a temperatura ambiente e, posteriormente, preservam-se na geladeira em caixas plÁsticas bem fechadas para evitar seu ressecamento.

Antes de usar, deve-se secar a superfície do meio. Para isso, coloca-se a placa aberta e invertida em estufa bacteriológica (37°C) durante 20 minutos (Figura 3) a 35°C. Gotas de água na superfície do meio sólido impedem a formação de colônias isoladas. Nas Figuras 2 a 4, são apresentadas técnicas de semeadura em meio sólido para obtenção de colônias puras isoladas.

Figura 2 - a) Placa de Petri com tampa aberta embaixo e acima inclinada a base aberta com o meio de cultura para baixo (posição para secagem, em estufa, da superfície do meio de cultura sólido antes de inocular); b) estufa bacteriológica aberta e c) placas de Petri abertas para secagem na posição da figura a e tubos com meio líquido em incubação



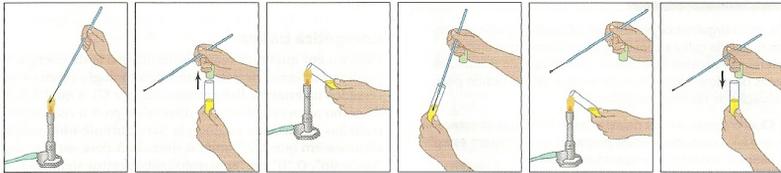
Fonte: Laborshopping (2015a).

A semeadura no meio de cultura sólido, assim como todo o trabalho no laboratório de microbiologia deve ser realizado sob condições de assepsia perto do bico de Bunsen ou na câmara de fluxo laminar.

A semeadura pode ser feita por estrias até esgotamento para obter colônias isoladas, utilizando alças de platina (Figuras 3 e 4). Pode-se também inocular em meio sólido por espalhamento na superfície e que consiste em colocar uma alíquota da amostra na superfície do meio sólido, preservando-se a esterilidade, distribuindo-a com alça bacteriológica de platina

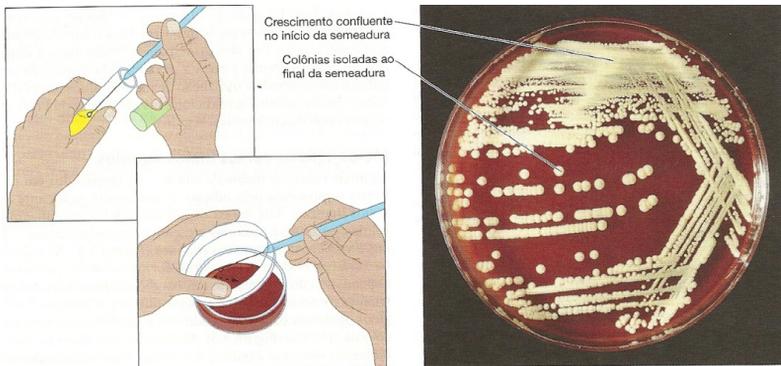
ou alça de Drigalsky, de vidro ou de plástico, procedimento usado na técnica de contagem padrão (Capítulo 7).

Figura 3 - Transferência asséptica de uma suspensão bacteriana para uma placa de Petri quando se trabalha em bancada com bico de Bunsen



Fonte: Cerqueira e Sant'anna (2007).

Figura 4 - Semeadura por esgotamento com alça bacteriológica para obtenção de colônias isoladas e placa após a incubação com colônias isoladas



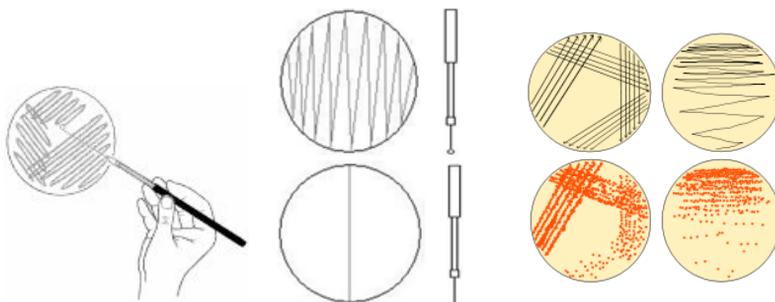
Fonte: Cerqueira e Sant'anna (2007), adaptado.

Metodologia para inoculação por estrias (esgotamento) em placa de Petri para obtenção de colônias isoladas

1. Agitar energeticamente o tubo com a amostra.
2. Esterilizar a alça bacteriológica na chama.

3. Abrir o tubo de ensaio com a suspensão bacteriana a ser semeada perto da chama e flambar suavemente a boca – não esquentar demasiado que pode quebrar o vidro. Não deixar a tampa do tubo na bancada para não haver contaminação; este deve ficar na palma da mão, a mesma que sustenta a pipeta e apertando na parte superior com o dedo mínimo. Ao flambar, gera-se uma zona quente ao redor da boca do tubo que impede a entrada de microrganismos contaminantes do ar.
4. Introduzir perto da chama a alça bacteriológica resfriada no tubo com a cultura, retirar a alça carregada; flambar a boca do tubo novamente, tampar o tubo e depositá-lo na grade suporte de tubos. Manter sempre a alça com o material na mão direita.
5. Com a outra mão, abrir perto do fogo a placa de Petri que está na bancada de trabalho em posição invertida, com a base para cima.
6. Estriar o cultivo para esgotamento (Figura 5).
7. Fechar a placa de Petri, esterilizar a alça por calor na chama e colocar as placas na estufa bacteriológica.

Figura 5 – Detalhes das sementeiras por estrias até esgotamento, alças e agulhas de inoculação, e placas de Petri com crescimento de diversas colônias isoladas

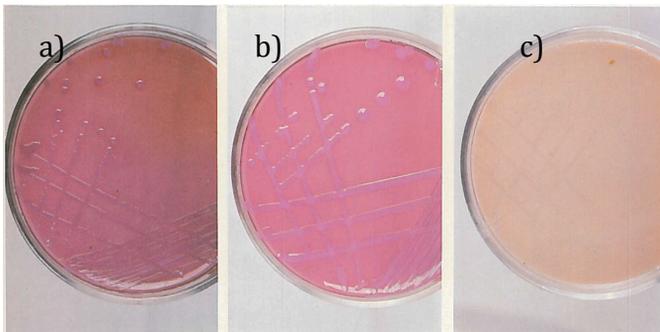


Fonte: Cerqueira e Sant'anna (2007).

A seguir, procede-se à incubação do meio de cultura inoculado em estufa bacteriológica calibrada na temperatura ótima de crescimento para as bactérias sob estudo. O tempo de incubação varia para os diferentes grupos bacterianos: para bactérias do trato entérico que crescem na faixa mesofílica, em geral é de 24 a 48 horas, e a temperatura pode variar de 35 a 37°C.

No meio sólido, observa-se o crescimento pelo desenvolvimento de colônias. Cada uma dessas colônias se formou teoricamente a partir de uma bactéria que ficou presa no ágar e se reproduziu localmente. Entretanto, podem ficar presas duas ou mais bactérias muito próximas que, ao se multiplicarem, produzirão colônias que se juntam, impedindo diferenciarem-se. Esse conglomerado provém de uma ou da junção de mais de uma colônia. Para fins de quantificação, assume-se que cada colônia é equivalente a uma única bactéria original. A formação de ácido ou álcalis visualiza-se pela mudança de cor do meio (Figura 6).

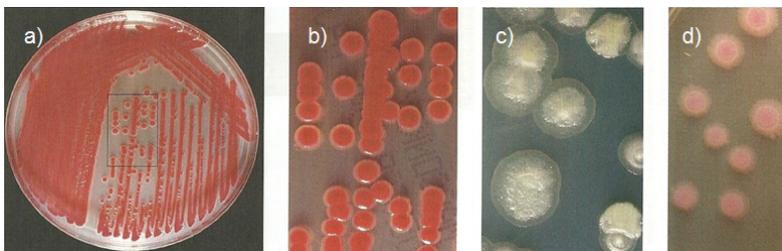
Figura 6 - Placas de Petri com meio de cultura Ágar de MacConkey inoculadas por estrias com alça bacteriológica, para obter colônias isoladas (da esquerda para direita: duas bactérias fermentadoras de lactose a) *E. coli* e b) *Enterobacter aerogenes* e uma não fermentadora c) *Shigela flexneri*



Fonte: Mara (1974).

O meio de cultura Ágar de MacConkey (Figura 7) recém-preparado é de cor vermelha suave, transparente a levemente opalescente em placas de Petri. As bactérias fermentadoras de lactose formam colônias cor-de-rosa-magentas intensas pela produção de ácido que diminui o pH < 6,8 causando a viragem do indicador (vermelho neutro).

Figura 7 - Placa de Petri com meio Ágar de MacConkey inoculadas por estrias com alça (da esquerda para direita): a) Colônias isoladas de *E. coli*; b) Ampliação da imagem da colônia de *E. coli*; c) Colônias de *Pseudomonas aeruginosas* no meio Trypticase Soja; d) *Shigela flexneri* em Ágar de MacConkey



Fonte: Madigan et al. (2010).

Quantificações mais próximas aos valores reais são obtidas quanto mais homogêneas sejam as amostras. Em amostras líquidas, a agitação é muito importante para quebrar os flocos bacterianos formados pela aglutinação das bactérias e contribuir com sua dispersão na matriz aquosa. Amostras sólidas são homogeneizadas em liquidificador estéril utilizando líquido de diluição específico e estéril.

Métodos de quantificação

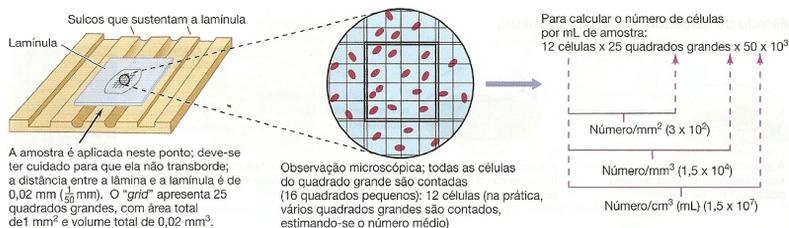
Os métodos de quantificação mais usados são métodos diretos em câmaras de contagem e os baseados no crescimento bacteriano.

1 – Métodos diretos de quantificação

Uma das metodologias mais comuns de quantificar células é com a contagem direta no microscópio, utilizando-se uma Câmara de Neubauer ou similar, também denominada hemocitômetro (por ser utilizada principalmente na quantificação das células do sangue, entre elas as hemácias) ou citada em geral como Câmara de Contagem.

Existem outras câmaras semelhantes como a de Petroff Hausser. São câmaras de contagem calibradas, com a superfície de contagem quadriculada e de volume conhecido, em geral 0,1 mL. Adiciona-se esse volume da suspensão bacteriana bem homogeneizada na câmara coberta por uma lamínula especial e se faz a leitura no microscópio óptico ou preferentemente de contraste de fase, que evita o uso de corantes. Na Figura 8, mostra-se uma câmara de Petroff Hausser.

Figura 8 - Contagem direta de bactérias em câmara de contagem de Petroff Hausser. Recomenda-se usar microscópio de contraste de fase que evita o uso de corante



Fonte: Madigan et al. (2010).

Procedimento com a câmara de Neubauer (referência P3a/UFRS)

O hemocitômetro ou câmara de Neubauer, assim como a de Petroff Hausser, é uma lâmina com duas subcâmaras para inclusão da amostra (Figura 9). Na fase inferior da câmara, uma grade está gravada no vidro. Essa câmara é um arranjo de quadrados de tamanhos diferentes para facilitar a contagem de células.

A lamínula de vidro que deve cobrir a câmara é colocada sobre a amostra e deve ficar fixada sem flutuar sobre o líquido, a uma altura de 0,1 mm para que seja possível determinar o número de células em um volume especificado.

A concentração de células não deve ser muito alta nem muito baixa. Se for muito elevada, as células se sobrepõem e são difíceis de contar. Se for baixa, maior será o erro estatístico. Deverá ser contado o maior número de quadriculados na câmara. Suspensões com altas densidades de células serão diluídas (1:10, 1:100 e 1:1000) com solução salina isotônica, preparando-se diluições decimais seriadas, como explicado no Capítulo 7. A diluição será considerada no cálculo da concentração final de células.

Figura 9 - Câmara de Neubauer

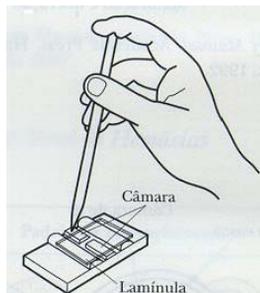


Fonte: Laborshopping (2015b).

Procedimento

1. Colocar a laminula sobre a área marcada na câmara de contagem. As laminulas são especiais e devem fornecer a profundidade correta da câmara de contagem. Não devem ser usadas laminulas comuns que não proporcionarão o volume de 0,1mL.
2. Homogeneizar bem a suspensão bacteriana e sob condições de assepsia, transferir 0,1 mL para um tubo de ensaio ou para um tubo eppendorf.
3. Adicionar 0,3 mL de corante azul de tripano 0,2% ao tubo, obtém-se a diluição 1/4. O uso de microscópio de contraste de fase evita o uso de corantes.
4. Misturar bem o tubo e retirar uma alíquota de 0,5 mL com pipeta (recomenda-se usar pipeta automática).
5. Deve-se encostar a ponta da pipeta na borda da laminula e deixar escorrer suavemente o líquido da pipeta. Preencher cuidadosamente a câmara de contagem, a suspensão deve preencher apenas um lado da câmara e não deve atingir os canais de laterais da área de contagem (Figura 10). Deixar as células sedimentarem por 2 minutos.

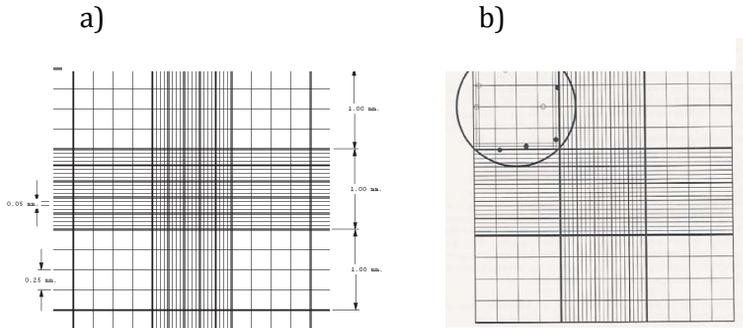
Figura 10 - Enchimento da câmara com a suspensão bacteriana a ser quantificada



Fonte: P3a/UFRS - Contagem de Células em Câmara de Neubauer (2015).

6. Focalizar no microscópio a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento (X 10 - Figura 11).

Figura 11 - a) Grade ou quadriculada das áreas para contagem e b) focalização

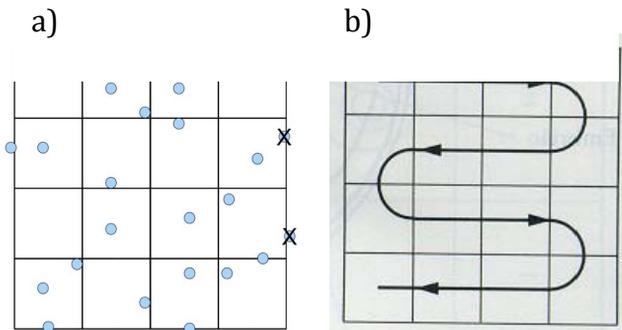


Fonte: P3a/UFRS - Contagem de Células em Câmara de Neubauer (2015).

Contar as células no quadrado central (com mais divisões internas) ou contagem das 4 áreas de maior quadriculado da câmara de contagem, seguindo o esquema da Figura 11, e dividir o valor por 4 para obter a média. Esta última opção é a mais utilizada.

As células situadas na linha divisória de uma grade devem também ser quantificadas. Para isso, define-se que as células na linha superior e direita de uma área quadriculada não serão contadas, mas sim as células localizadas na parte inferior e esquerda (Figura 12).

Figura 12 - a) Células para não serem contadas e b) Direção para a contagem



Fonte: P3a/UFRS - Contagem de Células em Câmara de Neubauer (2015).

7. A suspensão utilizada foi inicialmente diluída a 1/4, portanto o número de células contadas será igual à média dos 4 campos ou áreas contadas e multiplicadas pelo fator de diluição que foi 4.
8. O cálculo é então o seguinte: para obter o número de células/mL, deve-se multiplicar o valor obtido por 10.000, pois:

$$1 \text{ mL} = 1 \text{ cc}$$

$$1 \text{ cc} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$$

Na câmara de Neubauer, o número de células contadas está contido no volume de $0,1 \text{ mm}^3$, então se deve multiplicar por 10, portanto $10 \times 1.000 = 10.000$

Assim:

$$\text{N}^\circ \text{ total de células. mL}^{-1} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10.000}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}}$$

Exemplo: Contagens nos 4 campos: $35 + 57 + 69 + 48 = 209$ bactérias

$$= 209/4 \times 0,1 \times 10.000$$

$$= 52.250 \text{ bactérias.mL}$$

Em geral, as técnicas de quantificação direta não são muito apropriadas para bactérias de tamanho predominante pequeno (2 a 5 μm), mas sim para bactérias maiores e cianobactérias, algas, protozoários, etc.

2 – Técnica de Quantificação em Tubos Múltiplos

A quantificação de bactérias em meios de cultura líquidos tem implícito um erro maior que as contagens em meios de cultura sólidos. A técnica de tubos múltiplos é uma das mais antigas. É baseada em um método probabilístico de distribuição de partículas (bactérias) em diluição decimais por extinção. Cada uma das diluições é inoculada repetidas vezes sob as mesmas condições de meio de cultura, volume, temperatura e tempo de incubação. Após incubação pelo tempo adequado, faz-se a leitura dos tubos positivos que são identificados pela presença de turbidez, de mudança de cor do meio de cultura, ou pela formação de bolhas de gás, por exemplo. A combinação de tubos positivos de três diluições decimais consecutivas permite entrar em uma tabela que indicará a densidade bacteriana por 100 mL de amostra. O capítulo 9 descreve esta técnica com detalhes para a quantificação de bactérias coliformes.

3 - Técnica de contagem em placas de Petri de colônias de bactérias

Podem ser feitas contagens em placas de Petri depois de se ter propiciado o crescimento de colônias de bactérias pelas técnicas de “pour plate” para a contagem padrão (pela técnica de vertido em placa de Petri) ou de “spread plate” (de espalhamento em placa). As bactérias ficam aprisionadas no meio sólido com ágar, onde se multiplicam localmente formando colônias

que se podem quantificar a olho nu ou com ajuda de uma lupa. Esses métodos estão descritos em detalhes no Capítulo 7.

4 – Técnica de Membrana de Filtração

É apenas uma variação da técnica de contagem em placa de Petri. A diferença com as anteriores reside no uso de uma membrana de 45 mm de diâmetros e de poros pequenos (0,22 a 0,45 μm de diâmetro) através da qual se filtra a amostra líquida. As bactérias ficam retidas na superfície da membrana de filtração, parcialmente inseridas dentro dos poros. Após a filtração, a membrana é assepticamente transferida para uma placa de Petri pequena de 47 mm de diâmetro que contém o meio de cultura sólido ou líquido (neste último caso, o meio de cultura está saturando um disco ou “pad” de papel absorvente estéril do mesmo diâmetro). Incubam-se as placas de Petri em temperatura apropriada, durante o tempo necessário para o crescimento dessas bactérias específicas, e posteriormente procede-se à contagem das colônias crescidas a partir daquelas que ficaram presas dentro dos poros da membrana (uma colônia pode-se originar de uma bactéria ou de mais de uma que ficaram juntas dentro de um mesmo poro, mas para a contagem se assume que uma única bactéria formou a colônia).

Outras técnicas são variantes das quatro acima citadas e estão detalhadas nos diferentes capítulos deste manual.

Referências

CERQUEIRA, A.; SANT'ANNA, R. S. **Apostila de Aulas Práticas:** Disciplina Bacteriologia. Universidade Federal Fluminense/ Instituto Biomédico/Departamento de Biologia e Parasitologia. 2007, 80p.

GEISON, G. L. **The private Science of Louis Pasteur**. Princenton University Press. Chichester. 2014. 378 p.

LABORSHOPPING. Disponível em: <<http://laborshopping.com.br/produto/estufa/21083>>. Acesso em: 20 nov. 2015a.

LABORSHOPPING. Disponível em: <<http://laborshopping.com.br/produto/camara-de-new-bauer-melhorada/21083>>. Acesso em: 20 nov. 2015b.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160p.

MARA, D. D. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Churchill Livingstone, 1974. 209 p.

MICROBIOLOGIA Didática. Disponível em: <<https://microdidatica.wordpress.com/microbiologia-geral/meios-de-cultura/2-semi-solidos/>>. Acesso em: 20 set. 2015.

P3a/UFRS - Contagem de Células em Câmara de Neubauer. **Contagens Celulares e suas Aplicações em Microbiologia**. UFRS. PROTOCOLO BMM 577. Disponível em: www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf. Acesso em: 23 ago. 2015.

CAPÍTULO 6

Técnicas de amostragem de águas para análises microbiológicas

O monitoramento da qualidade de uma água ou de um ambiente qualquer é o conjunto de práticas que permitem medir e acompanhar as características de qualidade desse ecossistema e suas variações ao longo do tempo e do espaço.

No monitoramento da qualidade das águas naturais, são sistematicamente avaliadas as alterações das características físicas, químicas e biológicas, decorrentes de atividades antrópicas e de fenômenos naturais. As atividades ou práticas do monitoramento incluem a coleta de dados e de amostras em locais específicos feitas em intervalos regulares de tempo. As análises dessas amostras e da coleta dos resultados devem ser realizadas de modo a gerar informações organizadas num banco de dados. Estes dados são primordiais para a definição das condições presentes de qualidade da água e para a gestão adequada dos recursos hídricos, permitindo a caracterização e a análise de tendências nas bacias hidrográficas, sendo essenciais para os cuidados com a saúde pública e várias atividades de gestão, tais como planejamento, outorga, cobrança e enquadramento dos cursos de água.

As análises de uma amostra de água iniciam-se no momento da coleta, pois de nada adianta o emprego de técnicas sofisticadas no isolamento, quantificação e identificação

de microrganismos, se a amostra foi mal coletada e/ou mal preservada. Contaminações, durante a coleta, ou morte ou reprodução microbiana, durante o transporte, afetarão os resultados fornecendo dados falsos que confundirão a avaliação final. A confiabilidade dos resultados analíticos depende da adequabilidade desses procedimentos e é necessário seguir as orientações e os passos metodológicos corretos.

A importância da coleta pode ser focada em pelo menos quatro de seus múltiplos aspectos: a escolha do local de coleta, que deve ser representativo do universo que se deseja analisar; do procedimento de coleta; da preservação e do transporte da amostra.

A escolha do ponto ou dos pontos de amostragens e a metodologia de coleta de amostras são fundamentais para a obtenção de resultados realistas, que reflitam a condição de qualidade do corpo aquático e do ambiente em geral.

A metodologia de coleta depende dos objetivos da análise, do ambiente, do local e do ponto de coleta e do tipo da água analisada. Serão metodologias diferentes para águas potáveis (na saída da estação de tratamentos de água - ETA, no sistema de distribuição, de uma torneira, etc.), para águas de mananciais e para águas de poços, por exemplo. Consideram-se, neste tópico, dois tipos de águas: de mananciais destinados a múltiplos usos, com prioridade para o consumo humano após potabilização e águas potáveis de torneiras ou de outras origens e sistemas de distribuição e/ou armazenamento.

A - Monitoramento de Mananciais Superficiais de Usos Múltiplos

No Brasil e em particular no Nordeste, as fontes predominantes de água para abastecimento humano são reservatórios superficiais. Construídos pelo barramento de cursos hídricos,

provocam grandes modificações na paisagem e na dinâmica dos ambientes aquáticos, que alteraram o equilíbrio físico, químico e biológico precedente ao transformar um ambiente lótico para lêntico.

A escolha do ponto ou dos pontos de amostragens e a metodologia de coleta de amostras são fundamentais para a obtenção de resultados que reflitam a real condição de qualidade do corpo aquático. Ressalta-se a importância do cuidado especial com as coletas, pois se executadas de maneira inadequada podem comprometer os resultados, tornando-os duvidosos e/ou gerando falsas interpretações e projeções.

Uma técnica acurada e validada minimizará as diferenças entre os técnicos que processam as amostras de água e permitirá a comparação e avaliação segura dos dados, assim como a elaboração de melhores estratégias de manejo dos reservatórios. Medidas de segurança nos laboratórios quanto no campo durante as coletas são capazes de eliminar ou mitigar bastante os riscos de acidentes de trabalho e doenças ocupacionais, preservando a saúde e a integridade física dos técnicos e pesquisadores.

No monitoramento da qualidade da água de um manancial de usos múltiplos, entre eles como fonte de água potável, se o objetivo é conhecer a qualidade da água aduzida à ETA uma única amostra num único ponto numa profundidade prefixada (de captação da água para a ETA) em um único horário de um único dia por mês, fornecerá resultados suficientes para o conhecimento da qualidade da água a ser tratada, mas limitados sobre a real condição da água do manancial.

Se o objetivo for mais amplo, como confirmar a suspeita de contaminações pontuais intermitentes, pode ser mostrado um único ponto numa única profundidade em vários horários de um único dia. Os resultados permitirão avaliar a variação da qualidade microbiológica da água nesse local ao longo de

24 horas (estudo do ciclo nictemeral). Podem ser mostrados vários pontos da subsuperfície do corpo aquático num único horário ou num intervalo de 2 ou 3 horas. Nesse caso, serão obtidas informações sobre os compartimentos horizontais do ambiente aquático para um determinado horário.

É importante registrar o horário e a data de coleta, pois a qualidade da água de um ou de vários pontos de um ambiente lântico (ou lótico) é variável ao longo do dia, da semana, dos meses, da estação climática ou das épocas de seca e de chuva. Outros estudos precisam amostragens ao longo da coluna de água em vários pontos em diferentes profundidades.

Em relação à interpretação dos resultados das análises microbiológicas, devem ser consideradas variáveis ambientais (físicas, químicas e biológicas do próprio corpo aquático) que definem a qualidade da água e que influenciam na composição de sua biota. Destacam-se: temperatura, pH, condutividade elétrica e salinidade, concentração de matéria orgânica biodegradável (DBO_5), matéria inorgânica como silte, argila e sólidos em suspensão expressos geralmente como turbidez, entre outros.

A presença de algas e de cianobactérias deve ser monitorada por alterarem parâmetros ambientais como o pH, que em sistemas lânticos tropicais podem atingir valores de até 9 - 9,5. Esses valores correspondem aos momentos de maior atividade fotossintética e, portanto, de elevada produção de oxigênio molecular que pode alcançar concentrações de supersaturação (iguais e até maiores que 20 ppm). Esses fenômenos ocorrem nas horas de máxima insolação, maior pH e maior concentração de oxigênio dissolvido na água, que sob intensa insolação e altas temperaturas produzem radicais livres que causam taxas mais elevadas de morte de bactérias. Altas concentrações de algas e de cianobactérias afetam diferentes tipos de bactérias e a presença e diversidade de protozoários e rotíferos predadores.

As cianobactérias constituem um perigo adicional à qualidade da água pela capacidade potencial de numerosas espécies de produzir cianotoxinas que se bioacumulam nas células de protozoários, crustáceos, animais e o homem e se biomagnificam ao longo das cadeias e teias alimentares.

Cianotoxinas em baixas concentrações, na ordem de um a três microgramas, causam graves problemas de saúde. Com alvos no sistema nervoso (neurotoxinas), no fígado (hepatotoxinas) e na pele (dermatotoxinas), podem causar desde leves alterações celulares até tumores e morte.

A Portaria N^o 2914/2011 do Ministério da Saúde legisla sobre o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas nos mananciais e estabelece a frequência de amostragem em função da densidade dessas células e do monitoramento das concentrações de cianotoxinas no manancial, ao longo do tratamento, na saída da ETA e na entrada das clínicas de hemodiálises (BRASIL, 2011).

A matéria orgânica exerce ação protetora sobre as bactérias, impedindo ou dificultando o efeito dos fatores supracitados e partículas de silte e argila podem adsorver microrganismos na sua superfície e sedimentá-los.

Dentre os fatores climáticos que influenciam na qualidade microbiológica, destacam-se temperatura, radiação solar, intensidade da radiação, horas de luz solar, umidade relativa do ar, precipitação e ventos. Estes dados devem ser obtidos em campo ou solicitados a uma estação meteorológica.

Coleta de Amostras

As águas a serem coletadas para o exame bacteriológico devem ser colhidas com esterilidade e em pontos representativos da planta de tratamento, do sistema de distribuição, da fonte receptora ou do manancial. A análise deve ser feita com

uso de métodos-padrões a fim de se poderem comparar os resultados de diferentes épocas em diferentes regiões.

Recipientes de Coleta para Amostras de Água

São vários os recipientes que podem ser usados e a escolha depende do tipo de água, do volume a ser coletado e da técnica.

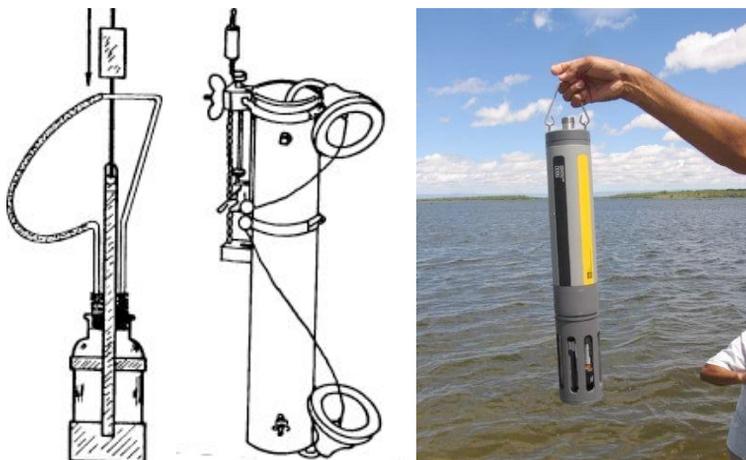
Em geral, são apropriados frascos de vidro neutro (preferentemente escuros) com tampas de boca larga protegida com papel tipo Kraft ou de alumínio e capacidade mínima de 120 mL (para se obter uma amostra representativa). Mas podem ser de plástico (polipropileno) autoclaváveis e sacos de plásticos estéreis descartáveis.

As tampas e os gargalos dos frascos devem ser protegidos com papel tipo Kraft ou de alumínio colocados antes da esterilização, que têm a função de evitar contaminações durante o manuseio. A esterilização será feita a 170°C em estufa durante 1 hora 30 min ou até duas horas e até 45 minutos se for calor úmido (autoclave)

A coleta deve ser feita preservando-se a esterilidade do frasco, para não se incorporarem à amostra microrganismos do ar, do solo ou da própria pele da pessoa que faz a coleta. Quando se supõe ocorrência de contaminação do recipiente, este deverá ser trocado por outro novo estéril. O volume mínimo de água coletada será de 100 mL se for para análises microbiológicas para indicadores sanitários de contaminação fecal e maiores se forem para algas, cianobactérias, cianotoxinas, etc. Recomenda-se não encher os frascos, deixar um espaço com ar é recomendável para facilitar a mistura da amostra antes da análise.

Os amostradores da Figura 1 permitem a coleta de amostras para análises biológicas em profundidade.

Figura 1 - Amostrador de Zobell e garrafa tipo Van Dorn



Fonte: ABNT - NBR 9098 (1987).

Coleta de Amostras de Água de Rios e Lagos

Os pontos de coleta em um manancial serão escolhidos por pessoal especializado de acordo com o que se deseja avaliar: a) no ponto de captação da água para a ETA, b) em rios, lagoas e reservatórios da água para se avaliar a intensidade e efeito da carga poluidora. Um fator importante a ser previamente definido é a frequência da amostragem.

Em reservatórios naturais utilizados como fontes de água potável, os pontos de coleta serão próximos ao ponto de captação e na mesma profundidade que este.

Na avaliação geral da qualidade da água de um manancial, as amostras não devem ser coletadas nas bordas do reservatório, porque, nessa região, há acúmulos de matéria orgânica, crescimento de plantas e insetos o que eleva o teor de bactérias indicadoras e os resultados não são representativos da massa aquática. Entretanto, estudos específicos sobre a

poluição das zonas de margens, precisam de coletas nesses locais.

Em águas superficiais onde se deseja determinar a origem e extensão da carga poluidora, os pontos de amostragem devem localizar-se no ponto de descarga do material poluidor, antes e depois dele, e ao longo do rio, para se conhecer sua capacidade de autodepuração e taxa de sobrevivência de bactérias ou outros microrganismos específicos. O número de pontos de coleta e a frequência de amostragem, usualmente representam um compromisso entre as limitações físicas do laboratório e a detecção dos picos de poluição.

Coleta de Amostra de Água Potável em Torneira

Para coletar água de torneira e águas cloradas em geral, o frasco deve ser esterilizado contendo tiosulfato de sódio no seu interior ($100 \text{ mg.litro}^{-1}$ de água) para eliminar o cloro residual. O cloro remanescente na amostra de água potável pode destruir as bactérias ali presentes durante o armazenamento e seu transporte até o laboratório, e os resultados não serão representativos da realidade.

Bolsas plásticas estéreis que se destinam à coleta de água para análises microbiológicas em substituição dos frascos de vidro são muito práticas, ocupam menos lugar para seu transporte, de fábrica possuem a marca de 100 mL facilitando a coleta e contém no interior uma pastilha de tiosulfato de sódio. Mas também são fornecidas bolsas sem tiosulfato, para a coleta de amostras não cloradas. Serão utilizadas bolsas com tiosulfato de sódio exclusivamente para a coleta de águas cloradas como as águas potáveis já que a finalidade é neutralizar o cloro presente na amostra.

A confiabilidade dos resultados analíticos depende do procedimento de coleta e de transporte das amostras. Não

se deve depositar o material de coleta sobre superfícies que não foram higienizadas, não falar, tossir ou espirrar próximo ao ponto de coleta ou do recipiente a ser usado para a coleta.

Coleta de Água de Torneira com Bolsas Plásticas

A coleta de água de torneira deve seguir o procedimento de coleta passo a passo, mostrado nas Figuras de 2 a 9.

1. A coleta deve ser feita em torneiras sem vazamentos;
2. Identificar a bolsa para a coleta do ponto específico escrevendo na tarja branca;

Figura 2 - Sacola estéril para coleta da amostra de água potável da torneira



Fonte: LACEN/SC (2015).

3. Pode ser suficiente colocar apenas um número que corresponda ao da ficha de dados (Auto de Coleta);
4. Lavar as mãos com álcool 70%;

Figura 3 - Lavagem das mãos com álcool 70%



Fonte: LACEN/SC (2015).

5. Higienizar a torneira por fora;

Figura 4 - Higienização da torneira por fora com álcool



Fonte: LACEN/SC (2015).

6. Abrir a torneira, deixar correr a água por alguns minutos para se eliminar aquela que ficou retida na tubulação (pode estar contaminada);
7. Fechar a torneira e secar com pano limpo;
8. Esterilizar a torneira passando um cotonete grosso ou um chumaço de algodão embebido em álcool pela parte externa e se deixa queimar uns minutos;

9. Abrir novamente, regular o jato de água para que não seja muito forte e respingue água, deixar sair um pouco de água e coletar aproximando o recipiente;
10. Colocar as luvas;
11. Tirar o lacre do saco plástico;

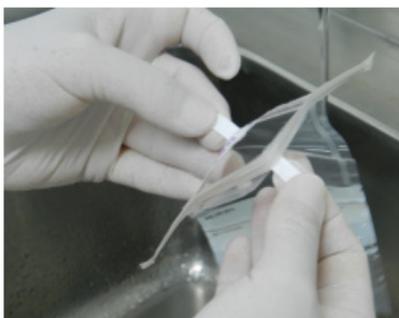
Figura 5 - Retiro do lacre do saco plástico



Fonte: LACEN/SC (2015).

12. Com auxílio das fitas brancas laterais, abrir o saco;

Figura 6 - Abertura do saco de coleta com cuidados de assepsia



Fonte: LACEN/SC (2015).

13. Coletar a amostra de água até a marca de 100 mL;

14. Em seguida, pressiona-se a bolsa desde fora para eliminar o excesso de ar;
15. Dobrar a borda superior duas vezes sobre si mesma, girar o saco sobre si mesmo, até que fique bem rígido (2 a 4 voltas);

Figura 7 - Fechamento do saco de coleta



Fonte: LACEN/SC (2015).

16. Dobrar as pontas do saco no sentido contrário do que foi girado, fixando uma a outra para que fique bem fechado;

Figura 8 - Finalização da coleta



Fonte: LACEN/SC (2015).

17. As amostras são acondicionadas, com cuidado, em caixa térmica com gelo preferentemente reciclável. Evitar o contato do gelo com as amostras. Podem-se usar grades divisórias para acondicionar as amostras para que não escorreguem na caixa ou sustentá-las dentro da base de um garrafão PET. A temperatura de armazenamento e de transporte deve ser mantida entre 4 a 10°C.

Figura 9 - Acondicionamento das amostras na caixa térmica com gelo



Fonte: LACEN/SC (2015).

18. Caso seja utilizado um frasco estéril, o procedimento é semelhante exceto que a amostra será coletada num frasco de boca larga com a tampa e o gargalo protegidos com papel metálico ou papel tipo Kraft. Tirar a tampa sem retirar o papel, colocar o frasco debaixo do jato de água da torneira, encher até o volume de 100 mL aproximadamente, tampar com cuidado, sustentando a tampa coberta pelo papel. Fechar bem, reservar o frasco na caixa de isopor à temperatura menor de 10°C. No laboratório, as amostras são processadas no período de não mais de 8h após a coleta.

Coleta de Amostra de Piscinas

Recomenda-se coletar água da superfície e a 30 cm de profundidade. Na superfície, forma-se um filme de gorduras proveniente do corpo de banhistas, e o número de bactérias é maior e não necessariamente representativo da massa de água restante.

Devem ser seguidos todos os cuidados descritos para os frascos estéreis no momento da coleta. Os frascos de coleta devem ser etiquetados com data, hora e lugar; nome do técnico que fez a coleta. Outros parâmetros que devem ser registrados no momento da coleta e úteis na análise dos resultados são a temperatura da água no ato de coleta, o pH e o cloro residual.

O frasco deverá conter tiosulfato e as coletas serão feitas na hora de maior concorrência. As amostras serão preservadas com gelo químico a temperatura inferior a 10°C e processadas em não mais de 8h após da coleta.

Coleta de Amostras em Balneários

Os pontos de coleta são aqueles mais concorridos. As amostras devem ser coletadas nas horas de pico; a frequência de coleta será aumentada em épocas de alta concorrência e com as chuvas.

Os frascos de coleta devem ser estéreis e etiquetados com data, hora, lugar e profundidade da coleta e com o nome do técnico que fez a coleta. No momento da coleta, deverão ser registrados a temperatura da água e o pH.

Tanto para piscinas como para balneários, podem-se usar kits para a medição de pH e de cloro, que permitem rapidez de medição e os valores fornecidos são suficientes para a interpretação dos resultados

Às vezes, são necessários barcos, frascos para coleta para profundidade, etc. Para mergulhar frascos em rios e lagos, foram mostradas figuras com frascos para mergulho sustentados por fios metálicos ou plásticos adequados para tais fins.

Conservação das Amostras

As amostras devem chegar ao laboratório sem modificação de sua população microbiana. O ideal é processar as amostras nas 2 horas seguintes, se não houver condições de sua preservação em ambientes resfriados, ainda em climas quentes 2 horas de espera podem alterar os resultados. Recomenda-se conservá-las em recipiente isolantes (tipo isopor) com gelo químico (ou gelo líquido em sacos plásticos) para manter a temperatura inferior a 10°C. Nestas condições, diminui-se a taxa metabólica dos microrganismos e a amostra se preserva durante 8 horas, mas deve ser processada logo após esse tempo. Alguns manuais recomendam 6 horas de frio e processamento nas duas horas seguintes (ou seja, num total de 8 horas após a coleta). Quando as condições locais impedem a análise nas 8 horas após a coleta, aconselha-se o emprego de laboratórios de campo ou de técnicas de “incubação retardada”. O tempo máximo que uma amostra refrigerada pode ser conservada é de 30 horas. Contudo, isto deve ser feito só em situações extremas, por exemplo, com amostras que são enviadas de lugares distantes pelo correio. O isopor pode ser substituído por garrafas térmicas esterilizadas. Nestes casos, é importante registrar o tempo entre a coleta e análise, para uma avaliação mais restrita dos resultados.

Referências

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9098 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro: ABNT, 1987, 22p. Disponível em: <<http://licenciadorambiental.com.br/wp-content/uploads/2015/01/NBR-9.898-Coleta-de-Amostras.pdf>>. Acesso em 25 de junho 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.
- LACEN/SC. **Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina**. Secretaria do Estado de Saúde. Superintendência de Vigilância em Saúde. Laboratório Central em Saúde Pública, 3p. Disponível em: <lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/coleta_agua.pdf>. Acesso em: 23 out. 2015.

CAPÍTULO 7

Contagem padrão de bactérias ou contagem de bactérias totais ou contagem de bactérias heterótrofas

São essas três designações que se usam para denominar a técnica que objetiva quantificar bactérias heterótrofas mesófilas presentes em amostras de água, também usadas para outras matrizes ambientais e para o controle microbiológico de alimentos.

Bactérias heterótrofas mesófilas são aquelas que usam matéria orgânica como substrato para seu metabolismo aeróbio ou anaeróbio que ocorre na faixa de temperatura mesófila, que varia de 20 – 25°C a 37 - 40°C. Entende-se por bactérias aeróbias, aquelas que se desenvolvem apenas na presença de oxigênio molecular, já as bactérias anaeróbias não crescem com oxigênio molecular, este é tóxico ao seu metabolismo, e as bactérias facultativas se desenvolvem tanto na presença como na ausência de oxigênio.

O controle da qualidade microbiológica de águas destinadas ao consumo humano é de fundamental importância para a prevenção da ocorrência de doenças de veiculação hídrica e para essa avaliação são usualmente empregadas as bactérias do grupo coliforme, em particular, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, cuja detecção na água evidencia o risco da presença de enteropatógenos.

Além da contaminação fecal, é fundamental que seja mantida sob controle a população bacteriana geral, visto que densidades elevadas de microrganismos na água contribuem com a deterioração de sua qualidade pela produção de limo ou biofilmes geradores de odores e sabores desagradáveis. Inclusive, biofilmes nas paredes internas das tubulações e dos reservatórios representam riscos à saúde pública porque podem acolher microrganismos patogênicos que ultrapassaram a desinfecção e podem proliferar no seu interior. Esses microrganismos serão descarregados de forma intermitente na água distribuída, junto com o desprendimento do biofilme.

Um risco adicional à saúde dos consumidores reside na possibilidade de ocorrerem números altos de bactérias totais na água de beber e algumas delas atuem como patógenos oportunistas. Foi observado que embora a biota normal das águas tratadas não contém microrganismos patogênicos, populações grandes de bactérias em águas potáveis podem incluir representantes dos gêneros *Pseudomonas* e *Flavobacterium* que, entre outros gêneros, são patógenos oportunistas que atingem pacientes debilitados em hospitais, creches e berçários, entre outros (GERRA, et al., 2006; DA SILVA et al., 2008). Outro aspecto importante é a influência inibidora de alguns desses microrganismos pela produção de metabólitos secundários com propriedades alelopáticas que em números elevados podem dificultar a detecção de coliformes, seja pela produção de fatores de inibição, seja pelo seu intenso desenvolvimento que sobrepuja a menor população de coliformes.

Foi confirmada a associação entre a frequência de detecção de coliformes e a densidade de bactérias totais, mas somente até níveis de 500 bactérias/mL. Quando a população bacteriana excede as 1000 UFC por mililitro, a frequência

de detecção de coliformes decresce. Há evidências da ação inibidora de *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Actinomyces* e leveduras (CAVALHERI; BRAMORSKI; TAVARES, 1996; MAZZOLA; MARTINS; PENNA, 2006; CDC, 2011).

Essa população não patogênica, mas que pode ser oportunista e está sempre presente na água potável, mede-se através do teste de Contagem Padrão em Placas (CPP). Destaca-se que todas as portarias do Ministério de Saúde sobre qualidade da água potável admitem a presença de um máximo de 500 UFC/mL de água tratada (Portarias N° 36/1990-MS, N°1469/2000-MS; N° 518/2004-MS e N° 2914/2011-MS) (BRASIL, 1990; 2001; 2004; 2011).

A determinação da densidade total de bactérias heterotróficas ou CPP, seja em águas brutas ou para consumo humano, permite conhecer as condições higiênicas da fonte e das águas tratadas para avaliação da eficiência das diversas etapas de tratamento e para registrar as condições higiênicas ao longo da rede de distribuição. Observou-se interesse crescente no desenvolvimento e na avaliação de novos métodos para a enumeração dessas bactérias.

Independentemente do método utilizado, é impossível obter a contagem total das bactérias presentes em uma água, devido estarem presentes diferentes tipos de bactérias cujas necessidades nutricionais e temperaturas ótimas para crescimento são variáveis. Um único meio de cultura e uma única temperatura de incubação não podem satisfazer às necessidades fisiológicas de todas as bactérias que podem estar presentes na amostra. Nesse sentido, deve-se ter uma visão clara das vantagens e limitações de cada método para a seleção adequada dos mesmos, segundo a finalidade da análise.

São três os métodos mais usados:

- **Fundamento dos métodos de contagem padrão em placa ou de contagem de bactérias heterótrofas mesófilas**

Todas as técnicas de contagem padrão em placa se fundamentam no crescimento das bactérias heterótrofas mesófilas de forma isolada. O princípio do método se baseia na premissa de que cada célula presente na amostra, que ficou aprisionada no meio de cultura com ágar endurecido depois de resfriado, multiplicou-se localmente e formou uma colônia separada e visível a olho nu, que pode ser contada com auxílio de uma lupa.

Entretanto, as bactérias no inóculo podem ficar agregadas em pares, cadeias ou em grupos diversos e juntas originarem uma colônia, duas ou mais, muito próximas que colapsam e impedem sua diferenciação no ato de quantificação. Independente do número de bactérias que deu origem a uma colônia (que não pode ser conhecido), usa-se a unidade UFC (Unidades Formadoras de Colônias) e se expressa a densidade de bactérias por mililitro de água. Estes fatores são importantes e podem se transformar em limitantes: a composição do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação utilizados.

Os meios de culturas são ricos em proteínas, açúcares, glicerídeos, extrato de levedura e compostos em geral, adequados ao crescimento de bactérias heterótrofas. A cultura é incubada em aerobiose durante 24 até 72 horas, a 35 – 37°C. O tempo de incubação depende do tipo de microrganismo e esse tempo deve ser uniforme para todas as amostras em estudo. Recomenda-se, em geral, a quantificação após 48 horas de incubação. Durante a incubação, deve-se manter o ambiente interno da estufa úmido (15%), para o qual se pode colocar na base um Becker com água destilada. Também podem ser utilizados sacos plásticos para colocar as placas de Petri no

seu interior e bem fechados. Se for necessária uma incubação prolongada, pode ser incluído um chumaço de algodão úmido dentro do saco.

Para a leitura, que deve ser cuidadosa se feita a olho nu, as colônias devem ser contadas com ajuda de uma lupa, pelo menos duas vezes cada placa. Placas não contadas no dia da leitura podem ser preservadas na geladeira entre 5 e 10°C, apenas por 24 horas. Existem, no mercado, contadores automáticos de colônias que usam placas de Petri especiais. Embora muito práticos, aumentam significativamente os custos das análises.

Dentre as técnicas oferecidas no mercado estão: espalhamento em placa, vertido em placa, membrana de filtração e um kit denominado *Bactéria Count Test*. Todas serão consideradas neste texto.

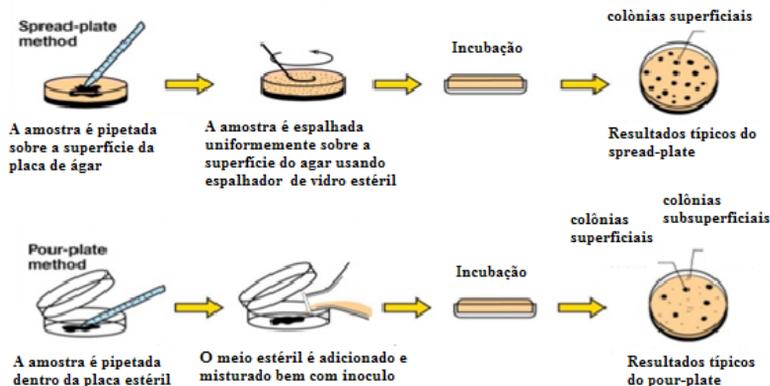
Apresentam-se a seguir duas das metodologias alternativas para a enumeração de bactérias heterotróficas, que se diferenciam em pequenos detalhes:

- A técnica de “pour plate”, ou de vertido em placa, envolve a adição do meio de cultura fundido ao inóculo colocado previamente numa placa de Petri estéril.
- A técnica de “spread plate”, ou de espalhamento em superfície, e consiste no espalhamento ou distribuição homogênea do inóculo da amostra na superfície do meio de cultura sólido e estéril.

Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens. A Figura 1 mostra os passos metodológicos dessas técnicas.

Figura 1 – *Spread Plate* ou Técnica de Semeadura em superfície ou de Espalhamento em Placa (esquema superior) e de *Pour Plate* ou Técnica de Vertido em Placa (esquema inferior)

Contagem Padrão em Placa (CPP) de Microrganismos Viáveis



FONTE: Fowler (2015).

Destaca-se a posição invertida das placas de Petri antes de serem colocadas dentro da estufa. A base para cima impede que, durante a incubação, gotas de água que evaporaram do meio de cultura e se condensam na tampa da placa, se desprendam e molhem a superfície do meio, o que facilita o crescimento confluyente das colônias de bactérias e impede sua quantificação.

Vantagens e Desvantagens das Técnicas

Spread plate: na técnica de espalhamento do inóculo na superfície do meio sólido, todas as bactérias se desenvolvem em colônias que crescem na superfície do meio de cultura, o que facilita sua visualização e contagem, além de permitir a

pronta distinção entre as mesmas e sua fácil diferenciação de partículas ou de bolhas de ar.

A principal limitação é o pequeno volume da amostra que pode ser usado (no máximo 0,5 mL). Volumes maiores encharcam o meio de cultura que não pode absorver toda a água e, em consequência, as colônias crescerão juntas formando um tapete devido à distribuição das bactérias por toda a superfície molhada do meio de cultura.

Pour plate: na técnica de vertido em placa, podem ser inoculados volumes da amostra de até 2 mL, o que é sua vantagem maior; as colônias ficam retidas dentro do ágar e são de crescimento lento e de tamanho pequeno. Raramente se formam aglomerados bacterianos, o que favorece sua contagem.

O principal fator limitante reside no fato de que o meio de cultura com ágar deve estar fundido para ser adicionado ao inóculo colocado previamente na placa de Petri estéril. Como deve ser mantido a 44°C - 45°C antes de sua adição à amostra, essa temperatura pode causar forte choque térmico nas bactérias. Além disso, as colônias de bactérias que crescem mergulhadas no ágar são pequenas e, às vezes, difíceis de quantificar.

Em termos de aplicação, a determinação da densidade de bactérias heterotróficas em águas é um instrumento importante e auxiliar do controle bacteriológico para:

- a. Avaliação da eficiência na remoção de bactérias nas diversas etapas de operação das estações de tratamento de água (ETA);
- b. Determinação das condições higiênicas da água tratada na saída e na rede de distribuição;
- c. Determinação das possíveis causas de deterioração da qualidade da água;

- d. Avaliação das condições higiênicas e de proteção de poços, fontes, reservatórios, piscinas e sistemas de distribuição de água para consumo humano;
- e. Estimativa da biomassa de bactérias heterotróficas presentes em corpos de água;
- f. Avaliação das condições higiênicas e da eficiência de operação de piscinas.

Procedimento para a Contagem Padrão de Bactérias Heterotróficas por Spread Count e Pour Plate

Material necessário: a) placas de Petri; b) pipetas graduadas; c) bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar. d) meio de cultura Plate Count Ágar ou substituto; e) estufa bacteriológica; f) contador de colônias.

Execução do ensaio

Devem ser obedecidas todas as observações sobre o trabalho no laboratório de microbiologia, descritas no Capítulo 4 e de coleta das amostras, descritas no Capítulo 6.

Águas de torneira devem ser coletadas em recipientes com o tiosulfato de sódio a 10% colocado nos frascos de coleta antes de sua esterilização para neutralizar a ação do cloro. Os passos metodológicos são:

1. O técnico deve usar jaleco e proteger os cabelos com touca descartável;
2. Observar a temperatura da estufa antes de iniciar qualquer processamento com bastante antecipação, para poder calibrá-la, se for necessário, e para que atinja a temperatura adequada de incubação antes de iniciar o ensaio;

3. A bancada é desinfetada antes do uso com álcool 70% ou água sanitária, e se deixa secar naturalmente;
4. Distribuem-se na bancada as placas de Petri a serem usadas, as pipetas esterilizadas e outros materiais que podem ser necessários, cuidando-se sempre da assepsia local;
5. Liga-se o bico de Bunsen e calibra-se a chama para que fique de cor azul;
6. O técnico lava as mãos e as desinfeta com álcool 70%;
7. Agita-se a amostra de água de forma enérgica umas 25 vezes para separar as bactérias que possivelmente formaram flocos e que se depositaram no fundo do frasco ou da bolsa de coleta;
8. Abrir com cuidado o pacote de pipetas ou o pipeteiro com as pipetas estéreis;
9. Perto do fogo, abrir a boca do frasco e flambar a boca;
10. Com assepsia, retirar uma pipeta e introduzi-la no frasco com a amostra recém-agitada retirando o volume desejado ou maior;
11. Transferir, com a pipeta estéril, 1 mL da amostra para uma placa de Petri previamente esterilizada; para isso, com a mão esquerda entreabrir a placa e adicionar o inóculo, repetir o procedimento com outro inóculo em outra placa de Petri agitando a amostra novamente (duplicata);
12. A seguir, entreabrir novamente a primeira placa de Petri e adicionar 20 mL do meio de cultura estéril, previamente fundido, e com a temperatura estabilizada em banho-maria a 44 - 46°C, contido em um tubo de ensaio. Repetir o procedimento com a segunda placa de Petri já inoculada;
13. Depositar as placas numa bancada de superfície lisa e sustentando-as pela tampa e com leve pressão

superior, homogeneizar seu conteúdo (inóculo e meio de cultura ainda líquido) com movimentos circulares moderados em forma de 8, várias vezes, consecutivas (em torno de 8 a 10 vezes). Deve-se proceder com cuidado para que o meio de cultura não endureça durante a agitação; nesse caso, ficaria uma superfície enrugada que dificultaria a contagem posterior das colônias. Deve-se cuidar também de evitar respingos de ágar na borda da placa de Petri;

14. Deixar de mexer as placas e esperar o meio de cultura se solidificar bem;
15. Depois de solidificado, colocar as placas em posição invertida e incubar a $35 - 37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas \pm 3 horas. Pode-se empilhar uma placa acima da outra, até um máximo de seis; para não impedir a distribuição homogênea do calor na estufa;
16. Finalizada incubação, procede-se à contagem das colônias com o auxílio da lupa e do contador de colônias;
17. Os resultados são expressos como n° de colônias de bactérias/mL ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC). mL^{-1} ;
18. Antes de iniciar uma nova análise, desinfetar a bancada do laboratório como feito anteriormente;
19. Não se esquecer de flambar a boca dos tubos de ensaio e dos frascos de coleta cada vez que sejam abertos. Dessa forma, gera-se um ambiente quente ao redor das bocas que impede a entrada de microrganismos do ar.

Na técnica de Spread Plate, procede-se de forma idêntica exceto que se inocula na superfície do meio sólido um volume inferior ou igual a 2 mL de água e se espalha perto do fogo com espátula de Drigalski, até esgotar o líquido.

Contagem Padrão em Amostras com Alta Contaminação Bacteriana

Para amostras com alta carga bacteriana como esgotos brutos (média de $10^7 - 10^{11}$ bactérias totais. mL^{-1}) ou diluídos, ou águas naturais com forte contaminação, se forem inoculadas diretamente nas placas de Petri alíquotas de 0,1 a 2 mL, cresceriam uma grande quantidade de colônias confluentes que formariam um tapete impossível de quantificar. De fato, toda amostra, com mais de 300 bactérias. mL^{-1} , deve ser diluída para permitir a contagem segura. Nesses casos, procede-se à diluição da amostra antes da inoculação.

Técnica para Preparação das Diluições Seriadas Decimais em Amostras com Elevada Concentração de Bactérias

As diluições decimais são realizadas com bastante facilidade, requerem apenas cuidados com a técnica, o tipo de líquido a ser inoculado, o líquido de diluição, que deve ser isotônico (isto é, conter a mesma concentração salina que as células bacterianas) e trabalhar com assepsia. São vários os líquidos de diluição que podem ser utilizados:

1. Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio a 0,85%);
2. Solução salina tamponada (mistura das soluções 1+2+3).

Solução 1:

- Pesar 34 gramas de Fosfato de Potássio Monobásico – (KH_2PO_4).
- Dissolvê-lo em 500 mL de água destilada.

- Ajustar o pH para 7,2 com Hidróxido de Sódio em solução normal (NaOH 1N).
- Diluir até 1 litro com água destilada.
- No geral, são necessários 175 mL de NaOH 1N, para elevar o pH até o valor citado.

Solução 2:

- Pesar 81,1 gramas de Cloreto de Magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).
- Dissolver em 1 litro de água destilada.

Solução 3:

- Adicionar 1,25 mL da solução 1 e 5 mL da solução 2 em 1 litro de água destilada. Agitar para homogeneizar.
- Distribuir em tubos de ensaio em quantidade que, após autoclavação, assegurem um volume de $9 \pm 0,2$ mL.
- Esterilizar os tubos em autoclave a 121°C ($1\text{Kg}/\text{cm}^2$ de pressão) durante 15 minutos.

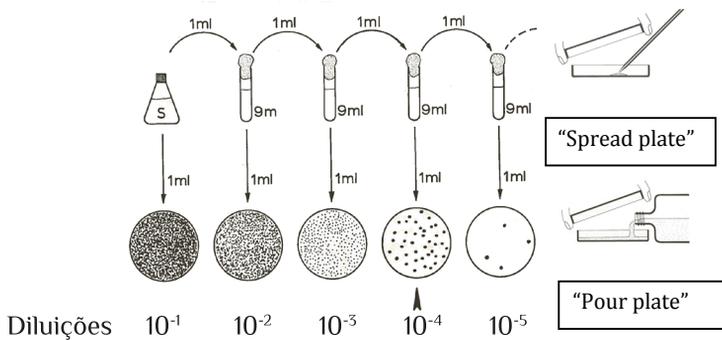
Procedimento para a Preparação das Diluições Decimais Seriadadas

1. Desinfetar a bancada com álcool 70% ou água sanitária 2,5%.
2. Agitar a amostra de água para homogeneizar as bactérias no seu interior.
3. Sustentar com uma mão um tubo de ensaio contendo $9 \pm 0,2$ mL de água de diluição estéril.
4. Retirar a tampa com a outra mão e sustentar a tampa com a palma da mão que sustenta a pipeta.

5. Adicionar com pipeta estéril 1 mL da amostra de água no tubo com líquido de diluição anterior sob condições de assepsia.
6. Descartar a pipeta num recipiente com desinfetante.
7. Misturar bem o tubo com líquido de diluição + inóculo da amostra: foi preparada a diluição 1:10 = 10^{-1} .
8. Com uma nova pipeta estéril tirar da diluição anterior 1 mL e inocular em outro tubo contendo 9 mL de líquido de diluição estéril.
9. Descartar a pipeta como feito com a anterior.
10. Agitar o tubo: foi preparada a diluição 1:100 = 10^{-2} .
11. Com uma nova pipeta estéril tirar da diluição anterior 1 mL e inocular em outro tubo com 9 mL de líquido de diluição estéril.
12. Descartar a pipeta como feito com a anterior.
13. Agitar o tubo: foi preparada a diluição 1:1000 = 10^{-3} .
14. Continua-se com o mesmo procedimento até atingir a diluição apropriada. Em geral, preparam-se diluições até 10^{-6} ou até 10^{-8} se for esgoto bruto desconhecido.
15. Preparadas as diluições, inocula-se, de cada uma delas, um volume conhecido (de 0,1 a 1mL) dentro da placa de Petri se for escolhida a técnica de “pour plate” ou na superfície do meio de cultura sólido se for a técnica de “spread plate”. Cada diluição deve ser semeada em duplicata.
16. Após a incubação a 37°C durante 48 horas, retiram-se as placas e se escolhem para contagem aquelas que contêm entre 30 a 300 colônias (ou UFC).

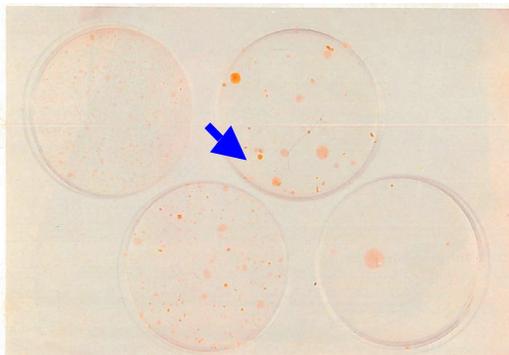
A seguir, apresentam-se algumas ilustrações dos procedimentos citados.

Figura 2 - Diluições seriadas decimais. A seta indica a diluição adequada para contagem



Fonte: Mara (1974).

Figura 3 - Placas de contagem padrão com colônias típicas, mostrando o crescimento com diferentes diluições. A seta destaca a melhor placa para a contagem.



Fonte: Mara (1974).

Quantificação e Cálculo da Densidade Total de Bactérias (UFC.mL-1)

Técnica de “pour plate” ou de vertido em placa, ou de espalhaento em superfície

As colônias cresceram dentro do meio de cultura após a solidificação deste. São pequenas e brancas na sua maioria, algumas têm cor amarela suave ou levemente rosa. A placa deve ser observada em diferentes posições devido às colônias crescerem na profundidade do meio em posição horizontal da placa de Petri, quando está apoiada na mesa de trabalho, na transversal ou inclinada.

Procede-se a contar todas as colônias que ficaram dentro do meio sólido, com cuidado para não confundir com bolhas de ar. A contagem pode ser manual, com canetas que registram o número após tocar com a ponta sobre a tampa da placa, ou na base desta (Figura 4).

Figura 4 - Contador manual de colônias com caneta para registro.



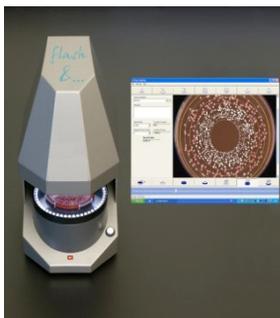
Fonte: Kitlabor (2015).

Figura 5 - Contador automático de colônias com ampliação da imagem



Fonte: Plasmatrix (2015).

Figura 6 - Contador automático de colônias Plasmatrix



Fonte: Plasmatrix (2015).

Figura 7 – Contador automático de colônias marca Colony Dot-It /UVP



Fonte: UVP (2015).

Cálculo da Densidade de Bactérias (UFC.mL⁻¹)

Após a incubação, são escolhidas as placas de Petri com aproximadamente 30 a 300 UFC, e é feita a contagem do número de colônias com auxílio de um contador de colônias. A equação para o cálculo de UFC.mL⁻¹ é:

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \text{número de colônias contadas/volume de amostra inoculada}$$

$$\text{Exemplo 1: UFC.mL}^{-1} = 285/2\text{mL} = 142,5$$

$$\text{Exemplo 2: UFC.mL}^{-1} = 285/0,5\text{mL} = 570$$

Técnica de Membrana Filtrante para Contagem Padrão

O princípio do método se baseia na retenção das bactérias nos poros de uma membrana de filtração, onde se multiplicam localmente ao ficarem em contato com o meio de cultura da placa de Petri. Esse meio difunde através da membrana, e as bactérias aprisionadas nos poros crescem formando colônias. Dentro de um poro, pode ficar aprisionada uma bactéria ou mais que originam uma única colônia. Considera-se, para fins de quantificação, que cada colônia provém de uma bactéria e a densidade da população se expressa como Unidades Formadoras de Colônias por mL de amostra – UFC.mL⁻¹.

De acordo com a carga bacteriana, a amostra bruta ou suas diluições serão filtradas sob condições de esterilidade, através de uma membrana estéril de acetato de celulosa atóxica de poros de 0,45µm ou de 0,22 µm, que retém as bactérias. Após a filtração, a membrana é transferida para uma placa de Petri de 47 mm de diâmetro estéril com meio de cultura sólido para Contagem Padrão e se incuba em estufa seguindo as recomendações já citadas para “pour plate” e “spread plate”.

Finalizada a incubação após 24 a 48 horas a 35 – 37°C, procede-se à contagem das colônias.

Para a quantificação de colônias em placas de Petri de 47 mm de diâmetro, serão escolhidas as placas com mais de 13 colônias, igual ou com menos de 80 colônias. Menores números reais na amostra indicam que havia maior número de bactérias na água que não conseguiram crescer devido à falta de espaço na placa de Petri. Na Figura 10, são mostrados equipamentos de filtração. Maiores detalhes se encontram no Capítulo 10.

Figura 8 – a) Sistema Millipore de filtração por membrana, em vidro, desmontado; b) Sistema montado de membrana de filtração em vidro.



Fonte: Alquilabor (2015).

Material necessário: a) sistema de filtração com porta-filtro; b) placa de Petri esterilizada de \varnothing 47mm; c) filtros de membrana de \varnothing 47mm e poros de 0,45 μ m (com cartão absorvente se o meio de cultura for líquido e sem cartão absorvente se sólido); d) meio de cultura para contagem padrão por membrana; e) água de diluição estéril; f) pinça de aço inox; g) copo de aço inox ou Becker de 50 mL; h) bico de Bunsen ou

lamparina a álcool; i) bomba de vácuo ou seringa); j) estufa bacteriológica.

Procedimento:

1. Todo o material deve estar estéril. Os funis de filtração e o suporte de filtro devem ser esterilizados após processar cada uma das amostras. Funis de plástico são os mais versáteis, não se quebram, possuem tampa, são os mais econômicos e podem ser esterilizados com ultravioleta (UV) – 30 minutos; ou fervura durante 30 minutos, ou em autoclave a 121°C durante 20 minutos.
 - Esterilização por UV: utiliza-se uma câmara de UV fechada; os funis limpos e secos são colocados dentro da câmara abertos, com a boca orientada na direção da luz UV, ao lado coloca-se a tampa invertida, ou seja, exibindo a parte inferior para a luz, e do mesmo modo se colocam os porta-membranas com a parte superior (onde se deposita a membrana de filtração) orientada para a fonte de luz. Aguardar 30 minutos, e após esse tempo, tampam-se os funis ainda dentro da câmara de UV, e se ajustam nas suas bases os porta-filtros das membranas. São retirados da câmara ainda tampados e são deixados dentro da câmara de fluxo laminar ou próximos aos bicos de Bunsen, para proteger de alguma contaminação eventual. Podem e devem ser esterilizados vários funis antes de iniciar as técnicas de quantificação para poder trabalhar com folga.
 - Esterilização por fervura: os três tipos de funis podem ser esterilizados por fervura. É utilizada

uma panela grande de inox ou de ágata, onde são mergulhadas as três partes (funis, tampas e porta-membranas). Finalizado o tempo de 30 minutos, são retiradas as partes e ainda quentes se montam os funis de filtração e se deixam prontos dentro da câmara de fluxo laminar ou próximos aos bicos de Bunsen.

- Esterilização por autoclavação: os três tipos de funis podem ser autoclavados. Previamente são montadas todas as partes. Os filtros de plástico são os únicos com tampa. Coloca-se a tampa na boca do funil e anexa-se com folga o suporte da membrana de filtração. Embrulham-se os sistemas de filtração individualmente com papel tipo Kraft, amarram-se com cordão ou com fita colante para autoclave e se esterilizam. Depois de 20 minutos a 121°C, são retirados da autoclave, deixam-se secar e resfriar e podem ser guardados na prateleira, para uso até 20 dias posteriores.
 - Esterilização por queima com álcool: somente funis de inox podem ser “queimados” com álcool. Sustenta-se o funil com pinça de metal, vertesse álcool para o interior do funil e procede-se à queima. Devem ser usados em curto tempo, pois esses funis carecem de tampa.
2. Preparar o meio de cultura, que pode ser líquido ou sólido. Seguir as indicações dos fabricantes para preparar o meio de cultura e esterilizar.
- Meio de cultura líquido: colocar, dentro da placa de Petri de 47mm de diâmetro, um cartão absorvente atóxico estéril com pinça também estéril (molhar em álcool 95% as pontas da pinça

e flambar na chama, deixar resfriar perto do fogo antes de uso) cuidadosamente para manter as condições de assepsia. Em cada uma das placas com cartão absorvente, adicionar, sob assepsia, 1,8 a 2 mL de meio de cultura previamente esterilizado e tampar as placas. Deixá-las em posição invertida, em sacos plásticos com zíper, dentro da geladeira a temperatura menor que 10°C. Reservar na geladeira e usar nas próximas 48 a 72 horas. Maior tempo pode ressecar o meio líquido.

- Meio sólido: preparar segundo as indicações dos fabricantes. Esterilizar, e, ainda quente, colocar com pipeta estéril 2 mL de meio de cultura em cada uma das placas de Petri de 47mm de diâmetro. Deixar solidificar e resfriar bem. Inverter as placas e guardar em um saco plástico com zíper, junto com um chumaço de algodão umedecido para manter a umidade interna. Fechar o zíper e reservar na geladeira em temperatura inferior a 10°C . Assim, preparadas as placas com meio de cultura e estéreis, podem ser usadas até 18 a 20 dias após prontas.
3. Desinfetar a bancada com álcool 70% ou água sanitária e deixar secar espontaneamente.
 4. Lavar as mãos e passar álcool 70%.
 5. Ligar o bico de Bunsen ou preparar a câmara de fluxo laminar.
 - Todas as etapas citadas devem, a seguir, ser executadas sob condições de assepsia.
 6. Colocar a membrana filtrante estéril no porta-filtro, com pinça previamente flambada e fria.

7. Agitar o frasco contendo a amostra, pelo menos 25 a 30 vezes.
8. Destampar e flambar a boca do frasco.
9. Verter cuidadosamente 100 mL de amostra (se for uma amostra pouco contaminada) no porta-filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores. Se for uma amostra com alta contaminação, preparar diluições decimais como vistas acima.
10. Ligar a bomba de vácuo (ou seringa) e fazer a sucção.
11. Depois de filtrada a amostra, lavar três vezes as paredes do funil de filtração com água de diluição estéril em porções de 20 mL aproximadamente. Para isso, adicionar e agitar suavemente o funil com o filtro, para ocorrer uma distribuição homogênea do líquido sobre as paredes internas. Lavar o funil para eliminar as bactérias que poderiam ter ficado aderidas e ligar a bomba de vácuo.
12. Após a lavagem e filtração, fechar o vácuo e remover o funil do suporte.
13. Com a pinça flambada e fria, remover a membrana do suporte do filtro e colocá-lo na placa de Petri, preparada anteriormente, com o lado quadriculado para cima.
14. Tampar a placa de Petri e incubá-la invertida a 35°C durante 24 ± 2 horas.
15. Após o período de incubação, examinar as colônias crescidas na placa e proceder à sua contagem. As colônias têm cor branca na sua maioria, mas depende do meio de cultura. Os cálculos são apresentados no Capítulo 10.

Kits para Teste de Contagem de Bactérias Totais (Teste Rápido) (Kit Bacterial Count Test/BT2; TCC/MAC e Ágar Dip Slide Technique/ OXOID)

Os kits BT2 e o Ágar Dip Slide/OXOID permitem a contagem rápida e aproximada da população das bactérias aeróbias viáveis que crescem a 35 – 37°C. São adequados para contar entre 10² até 10⁷ bactérias.mL⁻¹. São fornecidos já estéreis e prontos para uso.

O kit BT2, fornecido pela Wilhelmsen Ships Serviço, é constituído por uma placa de plástico de tamanho idêntico ao de uma lâmina de microscópio (27mm x 75mm) com meio de cultura com ágar não seletivo aderido na sua superfície (Cloreto de Trifenil Tetrazólio/ Ágar Contagem Padrão). Essa lâmina está fixada na tampa de um tubo também de plástico onde fica protegida sob condições de esterilidade até o momento de uso.

O Kit TCC/MAC possui de um lado uma lâmina a 37°C e com o meio ágar nutriente para contagem padrão e do outro Ágar Mac Conkey No 3, para coliformes totais se for incubada a 30°C e para coliformes termotolerantes se for incubada a 44°C. O Kit da OXOID é muito parecido, possui num lado da lâmina o meio ágar não seletivo para Contagem Padrão e no outro Ágar de Mac Conkey, para coliformes.

Para uso, retira-se a tampa com a lâmina e mergulha-se na amostra de água, esgoto, entre outras, durante cinco minutos. Após esse tempo, retira e coloca novamente dentro do tubo original. Incuba-se o tubo com a lâmina a 37°C durante 24 horas e procede-se à quantificação das colônias crescidas nos meios de cultura. O kit TCC/MAC e o da OXOID podem ser incubados a 37°C e a 44°C . No Ágar de Mac Conkey, na temperatura de 37°C, crescem coliformes totais e a 44°C

crecem preferentemente coliformes termotolerantes que são interpretados como *Escherichia coli*.

Após uso, os kits devem ser esterilizados antes de serem descartados. São testes úteis para águas potáveis, de esgotos, de rios, de represas e de águas de torres de resfriamento, entre outras.

É um teste rápido, econômico e muito simples, que precisa de um único equipamento: a estufa. É muito útil para uso em campo.

A leitura se faz com base em cartelas padrões.

- Ausência de crescimento se registra como $< 10^2$ bactérias.mL⁻¹
- Uma a três colônias se registram como 10^2 bactérias.mL⁻¹

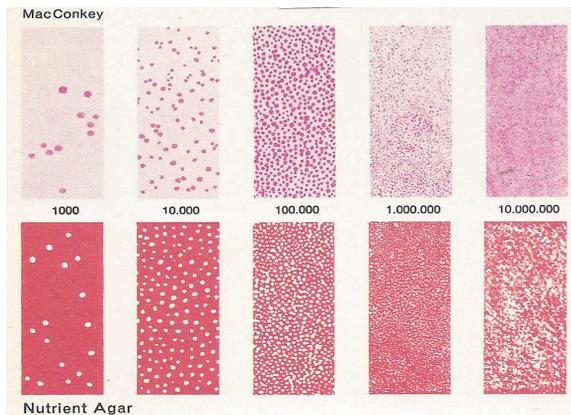
A seguir, são apresentadas Figuras dos kits e a cartela da OXOID para interpretação dos resultados.

Figura 9 - Kit Bacterial Count Test/BT2 (contagem padrão/bactérias totais); TTC/MAC (para contagem padrão/bactérias totais e de coliformes, simultaneamente)



Fonte: RMS (2015).

Figura 10 - Cartela OXOID para interpretação dos resultados dos testes com Dip Slides (lâminas de mergulho)



Fonte: Mara (1974).

Referências

ALQUILABOR. **Sistema de Membrana de Filtração**. Disponível em: <<http://alquilabor.com.br/vidrarias/sistema-de-filtrac-o-de-membrana-com-junta-esmerilhada.html>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36/MS/GM, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000. 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**, Brasília, 10 jan. 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 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, Brasília, n. 59, p.266-270, Seção I, 26 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.

CAVALHERI, N. A.; BRAMORSKI, A.; TAVARES, L. B. B. Avaliação da presença de *Pseudomonas aeruginosa* em águas potáveis consumidas no município de Blumenau (SC). **Bol. CEPPA**, Curitiba, v.14, n.1, p.59-64, jan./jun.1996.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2007–2008. **MMWR**, v.60, n. 12, p. 39-73, 2011.

DA SILVA et al. Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water. **Ant. van Leeuwenhoek**, v.93, p.323–334, 2008.

FOWLER, H. G. **Ecologia de populações**: crescimento microbiano. <<http://pt.slideshare.net/pepecologia/crescimento-de-bacteria>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

GUERRA, N. M. M.; OTENIO, M. H.; ZAMBERLAN, M. E.S. et al.. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 28, p.13-18, 2006.

KITLABOR. **Contador de Colônias Digital**. Disponível em: <<http://kitlabor.com.br/produtos/contador-de-colonias-digital.html>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

MARA, D. D. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Churchill Livingstone, 1974. 209p.

MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S.; PENNA, T. C. V. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a waterpurification system. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p.131, 2006.

PLASMATRONICS. **Contador de Colônias Automático**. Disponível em: <http://www.plasmatronics.com.br/cont_auto_col.html>. Acesso em: 20 ago. 2015.

UVP. **Colony Counting Just Got Easier**. Disponível em: <<http://www.uvp.com/colony.html#thumb>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

RMS. **Providing Solutions**. 10 BT2 DIPSLIDES. Disponível em: <<https://rmsupply.co.uk/dipslides/777-10-bt2-dipslides-general-purpose.html>>. Acesso em: 10 set. 2015.

CAPÍTULO 8

Teste de Presença-Ausência (P/A)

O teste de presença-ausência (P/A) foi proposto como tentativa no Standard Methods de 1985 e finalmente aceito na edição de 1989. O método permite avaliar de forma qualitativa a presença ou ausência de diversas bactérias indicadoras em um volume de 100 mL de amostra, utilizando-se um único frasco com meio de cultura específico.

Esta simplificação é útil para amostras de água potável nas quais os coliformes e outras bactérias devem estar ausentes em 100 mL de água. Simplifica a detecção, diminui custos e permite obter rapidamente resultados acurados. Outra grande vantagem do método é que permite analisar um número grande de amostras em curto tempo.

Em situações de emergência, como falhas no sistema de tratamento de água, ligações cruzadas, rompimento na rede de distribuição, interrupções no abastecimento de água devido a desastres que põem em risco a saúde da população, por exemplo, o método é de grande utilidade para uma avaliação microbiológica rápida e segura da qualidade da água.

No Brasil, as legislações sobre normas de qualidade para a água potável se remontam à Portaria N° 36/MS/GM, de 19 de janeiro de 1990 (BRASIL, 1990), a seguir a Portaria N° 1469/MS, de 29 de dezembro de 2000 (BRASIL, 2001), a Portaria N° 518/MS, de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004) e atualmente a Portaria N° 2.914/MS, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL,

2011). Todas elas incluem os testes de presença/ausência de bactérias coliformes em 100 mL de água.

A técnica permite a detecção de diversas bactérias além de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*. Dentre essas bactérias, são importantes em água tratada as *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas spp.*, e *Clostridium perfringens*. A possibilidade da identificação de outros indicadores, além dos coliformes, torna o teste importante não apenas na avaliação da qualidade da água de beber (potável ou não potável), mas também na avaliação sanitária de águas de piscinas, de águas engarrafadas, de poços, etc.

Para a validação do método e seu uso no monitoramento de rotina da rede de distribuição, por exemplo, o Standard Methods (APHA – AWWA - WPCF, 2012) recomenda a análise simultânea de pelo menos 100 amostras pelas técnicas tradicionais para coliformes (tubos múltiplos ou membrana filtrante) e pelo teste P/A. Após conferir a ausência de resultados falsos negativos ou falsos positivos, o teste P/A pode ser usado como único método. Quando uma amostra é positiva para coliformes no meio P/A, é necessário repetir a amostragem para aplicar algum dos testes quantitativos, até que os resultados se tornem novamente negativos.

O método P/A é simples, e consta de duas etapas: a presumtiva e a confirmativa.

Na primeira, usam-se meios de cultura não seletivos, que permitem o crescimento de coliformes e outras bactérias frequentes em águas, como *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus spp.* Na segunda etapa, utilizam-se meios de cultura específicos, seletivos para os possíveis microrganismos presentes na amostra. Todos os meios de cultura são líquidos.

O teste consiste em inocular, sob condições de assepsia, a amostra de água (100 mL) no frasco teste contendo o meio de cultura presuntivo estéril (fórmula apresentada a seguir). Após incubação, durante 24, 48, 72 e até 96 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, procede-se aos testes confirmativos.

Para coliformes totais e coliformes termotolerantes (antigamente denominados coliformes fecais), a incubação do meio presuntivo é feita, no máximo, até 48 horas. A incubação posterior é necessária para detectar outras bactérias indicadoras.

Atualmente, o teste P/A para bactérias coliformes está extremamente simplificado, com o uso de meios de cultura cromogênicos e fluorogênicos que se baseiam na ação de enzimas hidrolíticas sobre um substrato específico adicionado ao meio de cultura. São exemplos as metodologias de P/A que usam meios de cultura com ONPG/MUG; CPRG/MUG e ReadyCult Coliformes (X-GAL/MUG). Estes permitem identificar simultaneamente, numa mesma amostra e em 24 horas, coliformes totais e *E. coli* sem necessidade de confirmação posterior. Estas técnicas são explicadas no Capítulo 11.

A seguir, são descritos os métodos tradicionais de P/A aplicados na identificação de diversas bactérias em amostras líquidas.

Meio de Cultura

Caldo PA é utilizado para a detecção de bactérias coliformes em água das Estações de Tratamento de Água e em sistemas de distribuição.

Caldo P-A

Caldo Lactosado.....	13g
Caldo Lauryl Triptosa.....	17,5g
Púrpura de Bromocresol.....	0,0085g (dissolvido em 10 mL de NaOH – 0,1N)
Água Destilada.....	1 litro

O meio desidratado é comprado pronto em pó. Prepara-se seguindo as indicações dos fabricantes, dissolvendo o pó em água destilada ou bidestilada. Deve ser preparado em concentração tripla, de forma que ao adicionar a amostra de água, de 100 mL, a diluição dos ingredientes mantenha as concentrações apropriadas para o crescimento dos microrganismos presentes na amostra de água. Após adicionar água destilada aos ingredientes, mistura-se e se aquece suavemente para facilitar sua dissolução. Não se deve atingir a temperatura de ebulição. Distribui-se em volumes de 52 mL em frascos de 250 mL, contendo tubos de Durham invertidos no seu interior (usam-se como tubos de Durham tubos de ensaio de 12 mm x 75 mm) para capturar o gás produzido no metabolismo microbiano e se esteriliza em autoclave a 121°C durante 20 minutos. O pH do meio pronto deve ser $6,8 \pm 0,2$.

Observação: O meio de cultura contém púrpura de bromocresol, e este deve ser dissolvido em 10 mL de NaOH 0,1N e adicionado ao meio de cultura após a dissolução dos outros ingredientes, seguindo as indicações dos fabricantes.

Um meio de cultura presuntivo alternativo é preparado a partir do caldo de MacConkey.

Caldo MacConkey.....	30g
Triptona.....	5g
Água Destilada.....	1 litro

Prepara-se o meio em concentração tripla. Distribui-se de forma idêntica ao anterior e autoclave-se a 121°C durante 15 minutos. O pH final é 6,8 – 6,9 ± 0,2. Devem ser preferidos os meios de culturas prontos, produzidos por fabricantes reconhecidos.

Procedimento

1. Agitar a amostra de água vigorosamente pelo menos 25 – 30 vezes para se obter boa homogeneização e distribuição das bactérias ali contidas.
2. Sob condições de assepsia (em câmara de fluxo laminar ou perto do bico de Bunsen) inocular 100 mL de amostra no frasco com 52 mL do meio de cultura pre-suntivo P/A.
3. Incubar em estufa a 35°C durante 24 horas e até cinco dias, se for necessário.
4. Examinar os frascos todos os dias, verificando a presença de crescimento (turbidez), acidificação (cor amarela do meio) e produção de gás (bolhas de ar no tubo de Durham). A fermentação da lactose produz ácidos que causam a viragem do indicador da cor lilás ou púrpura, para a cor amarela. A produção de gás se observa no tubo de Durham, onde ficam presas bolhas de gás. O frasco que apresentar crescimento (que se verifica pela turvação do meio) e acidificação com ou sem produção de gás com alteração da cor do meio, deve ser submetido aos testes confirmativos. Os frascos negativos serão incubados novamente, e observados a cada 24 horas, até completar cinco dias.

Testes Confirmativos

Do frasco positivo para P/A, devem ser transferidas duas ou três alças para os meios líquidos específicos e uma alça para os meios sólidos (semeadura para obtenção de colônias isoladas).

Os meios para os testes confirmativos para coliformes são:

1. **Meio EC**- incuba-se a 35°C durante 4 horas, seguidas de 44,5°C durante 14 – 18 horas. Será confirmada a presença de coliformes termotolerantes (antigamente denominados coliformes fecais).
2. **Meio Verde Brilhante BÍlis 2% (VBB 2%)** – incubação a 35°C - 37°C durante 24 – 48 horas. Será confirmada a presença de coliformes totais.
3. **Meio Ágar Enterococcus** – incubação a 35°C durante 24 – 48 horas. Confirmará a presença de estreptococos fecais ou enterococos.
4. **Caldo Etil Violeta Azida (EVA)** – idem ao anterior.
5. **Meio Ágar, Manitol e Sal** – incubação a 35°C - 37°C, durante 24 – 48 horas. Confirmará a presença de *Staphylococcus aureus*.
6. **Meio de Drake** – incubado a 41,5°C por 72 horas. Confirmada a presença de *Pseudomona aeruginosa*.
7. **Meio Leite Desnatado** – confirmará a presença de *Clostridium perfringens*. Após incubação a 35°C por 24 – 48 horas.

Procedimento

1. Teste confirmativo para Coliformes Totais (CT)

Usa-se o Caldo Verde Brilhante BÍlis 2%. A partir do frasco P/A positivo, inocula-se 1 tubo contendo o meio

Caldo Verde Brilhante Bilis 2% que se incuba a 37°C por 24 – 48 horas. Turbidez e gás indicam coliformes totais positivos.

2. Teste confirmativo para Coliformes Termotolerantes (Ex-fecais)

- a. Meio EC – A partir do frasco P/A positivo, inocular dois tubos com meio EC e incubar um deles a 35°C e o outro a 44,5°C durante 24 – 48 horas. Quando houver produção de gás, o resultado é positivo para coliformes termotolerantes.
- b. Ágar de MacConkey – Transferir do frasco positivo de P/A uma alça para a placa de MacConkey e estriar com alça bacteriológica para obter colônias isoladas. Incubar a 35°C por 24 horas. As colônias de coloração rosa (lactose positivas), crescidas no Ágar de McConkey, serão repicadas para Caldo Lactose Púrpura (com púrpura de bromocresol) e para uma placa de Petri com Ágar gelatina.
- c. Os tubos com Caldo Lactose Púrpura – (PSA) tem tubo de Durham, no seu interior, para reter as bolhas de gás formadas no metabolismo fermentativo das bactérias.
- d. A partir da mesma colônia crescida no Ágar de McConkey e que foi inoculada em Ágar gelatina (para se observar a ação da enzima gelatinase que produz liquidificação da gelatina), faz-se o teste da oxidase.

2. Teste confirmativo para *Staphylococcus aureus*

- a. Meio Ágar Manitol Sal (Cloreto de Sódio) – A partir do frasco P/A positivo, inocula-se com alça uma placa de Petri contendo o Meio Ágar Manitol Sal. Após 24 – 48 horas a 35°C - 37°C, crescem colônias típicas de cor amarela brilhante, de 2 a 3 mm de diâmetro que

são submetidas: 1) à coloração de Gram, 2) ao teste de catalase, e 3) ao teste de coagulase ou Staphy-teste (PROBAC).

3. Teste Confirmativo para *Pseudomonas aeruginosa*

- a. Meio de Drake – A partir do frasco P/A positivo, transferem-se uma ou duas alças dessa cultura para o meio de Drake, que é líquido e se incuba a 41,5°C por 72 horas. A cada 24 horas, os tubos são observados sobre a luz UV (λ 366 nm) para verificação de fluorescência. Quando esta ocorrer, repica-se em Ágar Leite Desnatado.
- b. Ágar Leite Desnatado – Do tubo anterior, estria-se uma alça neste meio e, após incubar a 35°C durante 24 horas, é observada a presença de colônias verde-amarelas rodeadas por um halo transparente. Essas colônias emitem luzes fluorescentes ao ser iluminadas com UV(λ 366 nm).

4. Teste Confirmativo para *Streptococcus fecalis*

- a. Caldo Etil Violeta Azida (EVA) – 2 a 3 alças do frasco P/A positivos são inoculadas no caldo EVA, o qual é incubado a 35°C durante 24 – 48 horas. Quando no fundo do tubo se formar um botão de cor rosa ou lilás, o resultado é positivo.
- b. Ágar Enterococcus – Do tubo anterior, inoculam-se uma a duas alças em meio Ágar Enterococcus, utilizando o método de estrias para serem obtidas colônias isoladas. Após incubar a 35°C por 24 – 48 horas, observa-se o crescimento de colônias típicas: pequenas (0,5 a 1 mm de diâmetro), vermelhas escuras ou marrons. As colônias são submetidas ao teste de

catalase (para reconhecer se o metabolismo é aeróbio) o qual deve ser negativo; faz-se um esfregaço para proceder à coloração de Gram. A observação microscópica desse preparado deve mostrar bactérias em formas de cocos cor violeta ou roxo intenso, ou seja, cocos Gram positivos.

5. Teste Confirmativo para *Clostridium perfringens*

- a. Meio Leite Desnatado – O uso deste meio para cultivo de *Clostridium perfringens* deve ser realizado sob condições anaeróbias (sem oxigênio molecular no ambiente) favoráveis ao crescimento dessa bactéria. Para isso, o tubo com o meio de cultura é submetido à fervura durante 5 minutos. Após o resfriamento, realizar a inoculação em profundidade de 0,1 mL do conteúdo do frasco P/A positivo. O tubo é incubado a 35°C por 24 – 48 horas e examinado cada 24 horas para observar a presença de “fermentação turbulenta” do leite (o leite coagula pela ação metabólica do *Clostridium*, e esse coágulo é quebrado sob o efeito dos gases liberados na fermentação). A seguir, faz-se a coloração de Gram, a partir do crescimento no meio Ágar Leite, para se observar a presença de bastonetes Gram positivos esporulados, que confirmam a presença de *Clostridium* spp.

Interpretação dos Resultados

1. Coliformes totais positivos

- a. Crescimento e produção de gás em Caldo Lactosa Púrpura, e VBB 2% a 35°C.

- b. Crescimento de colônias lactosa positiva sem MacConkey (colônias cor-de-rosa de bordas lisas).

2. Coliformes termotolerantes positivos

- a. Crescimento e produção de gás nos meios EC e Caldo Lactosa Púrpura a 44,5°C.
- b. Crescimento de colônias lactosa positiva em MacConkey (colônias cor-de-rosa, de bordas lisas).
- c. Colônias crescidas em Ágar nutriente são oxidases negativas.

3. Teste para *Aeromonas ssp*

- a. Crescimento geralmente sem produção de gás em meio EC 35°C e no Caldo de Lactose Púrpura.
- b. Colônias crescidas em Ágar de MacConkey são lactoses positivas (cor-de-rosa) ou negativas (incoloras).
- c. Colônias crescidas em Ágar nutriente-gelatina são oxidases positivas.

4. Resultados para teste de *Pseudomonas aeruginosa* positivas

- a. Fluorescência no meio de Drake.
- b. Crescimento de colônias azuis esverdeadas e odor a “uva” no Ágar de MacConkey.
- c. Crescimento de colônias típicas com produção de pigmentos verdes e hidrólise de catalase ao redor das colônias em Ágar leite desnatado.

5. Resultados para teste de *Streptococos fecais* positivos

- a. Crescimento de colônias típicas vermelhas escuras em Ágar Enterococos, catalase negativa, cocos Gram positivos.

- b. Crescimento em caldo EVA.

6. Resultados para teste de *Clostridium perfringens* positivos

- a. Fermentação turbulenta do leite desnatado.
- b. Ao microscópio, observam-se bastonetes Gram+ esporulados, típicos de *Clostridium perfringens*.

7. Resultados para teste de *Staphylococcus aureus* positivos

- a. Colônias amarelas brilhantes de aspecto cremoso no Ágar Manitol.
- b. Cocos Gram positivos.
- c. Catalase e coagulase positivas.

Meios de cultura utilizados nos testes confirmativos

1. Meios de Cultura

1.1 Caldo MacConkey com Triptona – Meio Presuntivo

Caldo MacConkey.....30g
Triptona.....5g
Água Destilada.....1 L

Para os frascos de P/A, deve-se preparar o meio com concentração tripla. Pesar e dissolver os reagentes na água destilada e levar ao aquecimento até a completa dissolução, sem atingir a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 52 mL em cada frasco de P/A, com capacidade para 250 mL, contendo em seu interior tubos de Durham grandes (usam-se, como tubos de Durham, tubos de ensaio invertidos de 12 mm x 75 mm no interior dos frascos de 250 mL ou erlenmeyeres). Autoclavar com as tampas dos frascos levemente frouxas, a

121°C por 15 minutos. Retirar os frascos da autoclave, fechar totalmente as tampas e estocar os meios em temperatura ambiente.

Pode ser utilizado também como meio presuntivo alternativo o meio Caldo Lactosado/Lauryl Triptose, cuja formula é apresentada a seguir:

Caldo Lactosado.....13g
Caldo Lauryl Triptose.....17,5g
Púrpura de Bromocresol.....0,0085g (dissolvido em 10 mL de NaOH – 0,1N)
Água Destilada.....1 L
pH do meio: 6,8

Dissolver o caldo lactosado e o caldo triptose em água destilada e a púrpura de bromocresol em 10 mL de NaOH – 0,1N. Unir as soluções e homogeneizar. Distribuir 50 mL do meio nos frascos de P/A, adicionar o tubo invertido e autoclavar a 121°C por 12 minutos.

1.2 Meio EC – usado na etapa confirmatória do teste para coliformes totais e termotolerantes (ex-fecais)

Meio EC.....37g
Água Destilada.....1 L
pH final: 6,9 ± 0,2 a 25°C.

Aquecer até completa dissolução do meio sem atingir a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de cinco mL em cada tubo de 12 x 120 mm contendo em seu interior tubos de Durham invertido. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.3 Meio de Drake – usado para confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*

Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....0,5g

Sulfato de Potássio (K_2SO_4).....10g
Fosfato Dipotássico (K_2HPO_4).....1g
L- asparagina.....2g
Glicerina.....10g
Água Destilada.....1 L
pH final: 7,6 ±0,2

Dissolver os ingredientes em 1 litro de água destilada e aquecer sem deixar atingir temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5 mL em cada tubo de ensaio de 16 x 150 mm e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.4 Caldo Etil Violeta Azul (EVA) – meio confirmatório para a presença de estreptococos fecais

Caldo EVA.....35,8g
Água Destilada.....1 litro
pH final: 7,0

Dissolver o meio, sem deixar que atinja a temperatura de ebulição e distribuir 5 mL em cada tubo de ensaio de 16 x 150 mm. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.5 Meio de Leite Desnatado – para detecção de *Clostridium perfringens*

Leite Desnatado.....100g
Água Destilada.....1 litro
pH final: 6,4

Deixar pregos de ferro de 1 polegada de comprimento mergulhados em xilol por 24 horas, lavar várias vezes em água destilada e deixar secar por uma noite. Adicionar um prego em cada tubo de ensaio de 18 x 180 mm. Dissolver o meio em água destilada, cuidando para não atingir a temperatura de ebulição e distribuir 20 mL do meio em cada tubo contendo

um prego. Autoclavar a 121°C por 123 minutos. Conservar em geladeira por somente duas semanas antes do uso.

1.6 Caldo Lactose Púrpura – usado para detectar fermentação da lactose

Triptona.....	5g
Peptona Protease 3.....	10g
Extrato de carne.....	1g
Cloreto de Sódio.....	5g
Lactose.....	10g
Púrpura de Bromocresol.....	0,02g
Água Destilada.....	1 L
pH final: 7,0	

Aquecer até a dissolução dos componentes em água destilada, sem atingir a temperatura de ebulição e distribuir volumes de 5 mL cada tubo de ensaio de 16 x 150 mm, contendo em seu interior tubo de Durham. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Estocar até no máximo por duas semanas.

1.7 Caldo de Soja e Triptona – usado para enriquecer o inóculo e submetê-lo ao teste de coagulase

Caldo de Soja Triptona.....	30g
Água Destilada.....	1 L
pH final: 7,3	

Aquecer o meio até sua dissolução em água destilada, sem atingir a temperatura de ebulição e distribuir volumes de 5 mL do meio em cada tubo de ensaio. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.8 Ágar MacConkey – usado para isolamento dos coliformes

Ágar MacConkey.....	59g
---------------------	-----

Água Destilada.....1 L

pH final: 7,1

Adicionar ao meio, água destilada e aquecer até sua dissolução, sem atingir a temperatura de ebulição. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir volumes de aproximadamente 15 mL em cada placa de Petri de 15 x 100 mm.

1.9 Ágar Enterococos – usado nos testes confirmatórios para presença de estreptococos fecais.

M – Enterococos Ágar.....42g

Água Destilada.....1 L

pH final: 7,2

Dissolver o meio em água destilada sob aquecimento, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição, estabilizar a 45°C e distribuir em placas de Petri.

1.10 Ágar Nutriente Gelatina – usado para detectar produção de gelatinase (enzima que digere o Ágar)

Ágar Nutriente.....23g

Gelatina.....30g

Extrato de Levedura.....3g

Água Destilada.....1 L

pH final: 6,8

Pesar o Ágar nutriente, dissolver e aquecer em 500 mL de água destilada, sem atingir a temperatura de ebulição e adicionar extrato de levedura. Dissolver a gelatina separadamente nos 500 mL de água destilada restante e depois unir as duas soluções formando 1 litro. Autoclavar a 121°C por 15 minutos e distribuir 15 a 20 mL em placas em Petri de 15 x 100 mm.

1.11 Ágar Manitol Cloreto de Sódio – usado para isolamento e diferenciação de *Staphylococcus aureus*

Extrato de Carne.....	1g
Proteose Peptone.....	10g
Cloreto de Sódio.....	75g
D-Manitol.....	10g
Ágar.....	15g
Vermelho Fenol.....	0,025g
Água Destilada.....	1 L

Aquecer até completa dissolução do meio, sem atingir a temperatura de ebulição. Autoclavar a 121°C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri de 15 x 100 mm.

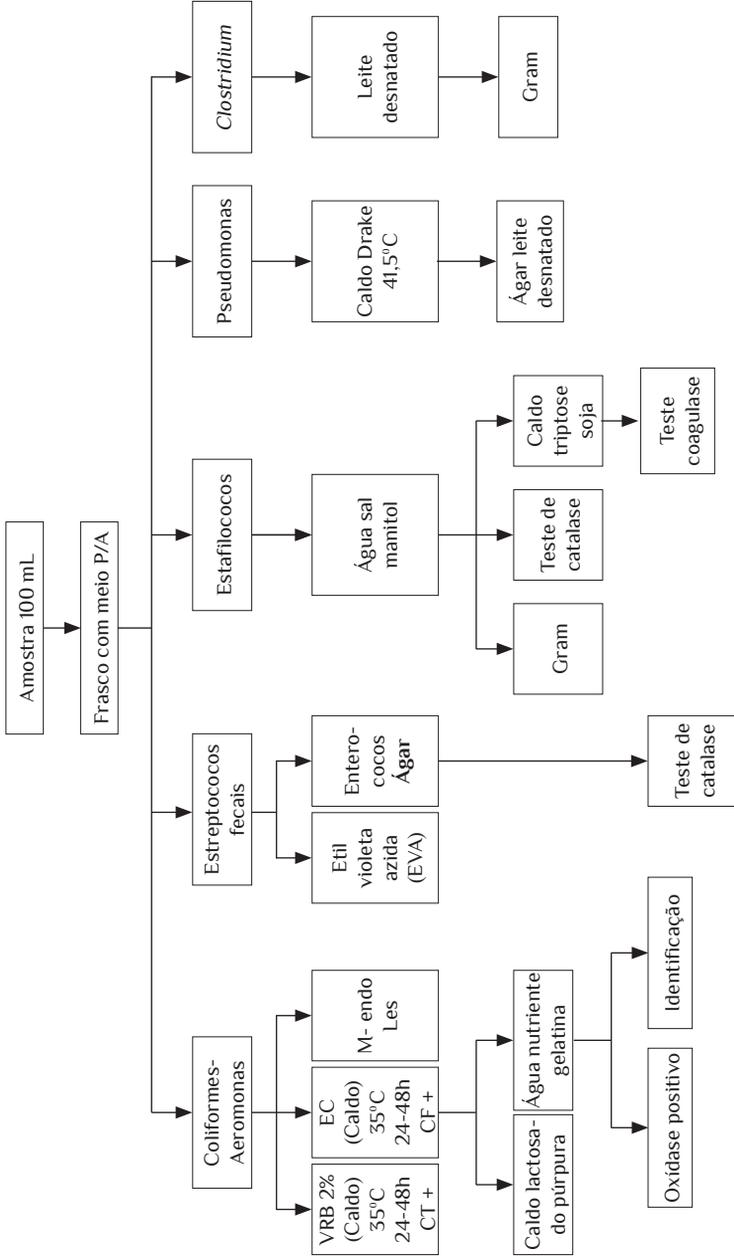
1.12 Ágar Leite Desnatado – usado para determinar pigmentação e fluorescência de *Pseudomonas aeruginosa*

Leite Desnatado.....	100g
Ágar.....	15g
Água Destilada.....	1 L

pH final: 6,4

Dissolver em água destilada, separadamente o Ágar e o leite desnatado. Aquecer até dissolução do meio, cuidando para não atingir a temperatura de ebulição e autoclavar separadamente a 121°C por 15 minutos. Retirar da autoclave, adicionar as duas soluções e distribuir 15 a 20 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm.

Procedimento Geral do Teste P/A.



Para a confirmação rápida da presença de enterobactérias possivelmente patogênicas, pode ser usado o teste de produção de H_2S , descrito a seguir.

Método Simplificado para detecção de enterobactérias possivelmente patogênicas

Teste Qualitativo (Teste H_2S)

O teste detecta a presença de enterobactérias produtoras de H_2S , tais como *Salmonella spp*, *Proteus spp* e *Edwardsiella spp*. Estas bactérias, presentes nas excretas, estão associadas à presença de coliformes de origem fecal na água e algumas são patogênicas, como *Salmonella spp*.

O método foi desenvolvido por Manja, Maurya e Rao (1982), e é útil para a detecção rápida de possíveis enteropatogênicos. Caracteriza-se pelo baixo custo, simplicidade de execução e fácil transporte. É útil em condições de campo, quando são escassos laboratórios bem equipados e pessoal especializado.

A detecção de H_2S como indicador de bactérias entéricas se baseia no fato de diversos microrganismos produzirem sulfeto hidrogênio (H_2S - ácido sulfídrico) a partir de aminoácidos sulfurados ou de compostos sulfurados inorgânicos. Numerosas proteínas são ricas em aminoácidos sulfurados como metionina, cistina e cisteína. Ao serem degradadas pela ação de enzimas de bactérias presentes no ser humano, no ambiente em geral e que crescem nos meios de cultura, as enzimas denominadas de sulfurases liberam enxofre, o qual é reduzido a H_2S . Pode também ser formado pela redução de compostos sulfurados inorgânicos, como os tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$), sulfatos (SO_4^{2-}) e sulfitos (SO_3^{2-}). O H_2S é incolor e, para visualizá-lo, incorporam-se no meio de cultura algumas substâncias que permitem sua detecção. Entre

as substâncias mais usadas está o sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

O meio SIM, além da determinação da produção de sulfeto de hidrogênio, fornece também mais dois testes: produção de indol e motilidade, diferenciando bastonetes entéricos. É útil para detectar especialmente *Salmonella* e *Shigella*. O meio contém peptonas e tiosulfato de sódio como substratos sulfurados, e sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{2-}$) que é o indicador da presença de H_2S . O ferro se combina com o H_2S formando um precipitado preto insolúvel de sulfeto ferroso, que evidencia a produção de H_2S . A ausência desse precipitado negro indica reação negativa. O nome SIM deriva justamente destes três testes (S de enxofre, I de indol e M de motilidade):

1 - Meio de Cultura SIM (meio sólido)

Digestão péptica de tecido animal 30g

Extrato de carne 3g

Ferro peptonizado 0.20g

Tiosulfato de sódio 0.025g

Ágar-ágar 3g

Água destilada 1L

pH final 7.3 ± 0.2 .

Pronto para uso na forma de pó.

Prepara-se seguindo as recomendações dos fabricantes. Depois de dissolvido na água destilada e aquecido até dissolver o Ágar, distribui-se em tubos, esteriliza-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos e deixa-se solidificar. Inocula-se com agulha até o fundo do tubo.

Meio de Cultura Peptona – Citrato Férrico (meio líquido)

Peptona 40, 0 g

Fosfato Dipotássico de Hidrogênio (H_2HPO_4) 3,0 g

Citrato Férrico 1,5g
Tiosulfato de Sódio 2,0g
Teepo 12,0 mL
Destilada 1,0L

Pesar os reagentes e acrescentar 100 mL de água destilada. Aquecer sob agitação até completar a dissolução. Cortar tiras de papel de filtro de 70 cm². Preparar frascos de MacCartney ou similares (frascos de vidro de 20 ml com tampa de rosca), colocando dentro uma fita de papel de filtro. Impregna-se esse papel com alguns ml do meio de cultura. Fechar os frascos e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Seguidamente, colocar os papéis de filtro numa placa de Petri aberta e introduzir na estufa a 50°C, até que o papel de filtro fique seco.

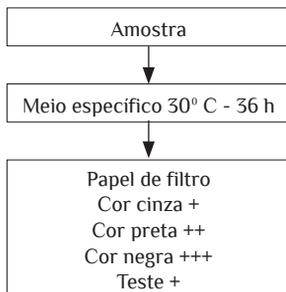
Procedimento

Inocular a amostra em frasco de MacCartney ou similar de até 20 mL e incubar durante 36 horas a 30°C ou a temperatura ambiente com papel de filtro impregnado no reagente.

Leitura

O papel de filtro ficará de cor cinza ou preta se houver a produção de H₂S. A reação química que acontece é a redução de tiosulfato de sódio e da cisteína do meio de cultura e liberação de H₂S (gás sulfídrico), o qual reage com o citrato férrico, formando um precipitado negro insolúvel. A coloração pode ser registrada com a seguinte simbologia: (+) cinza; (++) parcialmente negra; (+++) negra. Esses três resultados são positivos para bactérias produtoras de H₂S e, portanto, para coliformes totais e coliformes termotolerantes.

Esquema do Teste



Referências

APHA, AWWA, WPCF. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, L. S. Clesceri (Eds.). 22th ed. Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36/MS/GM, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000. 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**, Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 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**, Brasília, n.59, p.266-270, Seção I, 26 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.

MANJA, K. S.; MAURYA, M. S.; RAO, K. M. A simple field test for the detection of faecal pollution in drinking water. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, n.5, p.797- 801, 1982.

CAPÍTULO 9

Técnica dos tubos múltiplos para coliformes totais, coliformes termotolerantes (ex-fecais) e *Escherichia coli*

Os métodos de quantificação de microrganismos em meios líquidos têm maiores erros que aqueles que usam meios sólidos. As bactérias não estão homoganeamente distribuídas na matriz líquida, formam agrupamentos (agregados, colônias e biofilmes) que se depositam no fundo, nas paredes do recipiente ou flutuam. A agitação da amostra e de suas diluições é fundamental antes de sua inoculação no meio de cultura. A metodologia de tubos múltiplos é realizada em várias etapas sequenciais que facilitam a ocorrência de pequenos erros técnicos.

Técnicas de quantificação em meios líquidos são empregadas para conhecer a densidade de uma grande diversidade de bactérias nas quais a produção de gás para sua detecção faz parte do próprio teste. São utilizados meios seletivos que permitem identificar o microrganismo em questão e a maioria dos métodos possuem mais de uma etapa. Em geral, na primeira etapa (denominada presuntiva), estimula-se o crescimento de grupos bacterianos com metabolismo semelhante presentes na amostra e, na segunda (de seleção ou confirmativa), procede-se à escolha/seleção do grupo de interesse, com uso de meios de cultura mais seletivos.

Fundamentos do método

O método de tubos múltiplos tem como base o princípio de diluição por extinção: quando x mL da amostra é inoculado em uma quantidade adequada de meio de cultura e após o período de incubação, ocorre crescimento, pode-se afirmar que nos x mL da amostra havia pelo menos uma bactéria.

Da mesma forma, pode-se inocular alíquotas de 1 mL de diluições decimais da amostra (1 mL da diluição 10^{-1} , 1 mL da diluição 10^{-2} , 1 mL da diluição 10^{-3} e assim sucessivamente até 10^{-n} e $10^{-(n+1)}$) em tubos individuais com meio de cultura em quantidade e concentração apropriadas. Pode haver crescimento desde o primeiro tubo até o tubo 10^{-n} e ausência de crescimento no tubo $10^{-(n+1)}$. Então se deve interpretar que, no momento da inoculação, havia pelo menos uma bactéria em 1 mL da diluição 10^{-n} e nenhuma em 1 mL da diluição $10^{-(n+1)}$. Pode-se dizer que a amostra de água possui pelo menos 10^n bactérias por mL.

Por exemplo, se houve crescimento até a diluição 10^{-3} e não houve crescimento na diluição 10^{-4} , a amostra tem mais de 1.000 bactérias por mL e menos de 10.000 bactérias por mL. Ao se repetirem as mesmas inoculações com outro conjunto de tubos, pode ocorrer que o crescimento se verifique até a diluição 10^{-4} . Nesse caso, a amostra tem mais de 10.000 bactérias /mL e menos de 100.000/mL. Observa-se que para a mesma amostra de água se obtiveram dois resultados diferentes. Por quê?

A técnica de retirada de um volume menor de outro maior, onde estão partículas, é um processo estatístico. As bactérias não estão distribuídas de forma homogênea na amostra e nem nas suas diluições. Considerando que na diluição 10^{-3} há 10 bactérias, ao se extrair 1 mL pode ser que 1 ou 2 bactérias sejam extraídas; em uma segunda extração da mesma diluição, pode ser que não seja retirada nenhuma bactéria

e, em uma terceira, poderiam ser extraídas 3. Nesses casos, ocorrerá crescimento nos tubos inoculados com o primeiro e o terceiro volumes extraídos, e não haverá crescimento no segundo tubo.

Esses resultados mostram que o método não tem boa precisão e, por isso, recomenda-se repetir várias vezes a extração de um mesmo volume de uma única amostra ou de uma mesma diluição. Quanto maior for o número de vezes que se repete a extração e se proceda à sua inoculação, maior será a representatividade dos resultados obtidos. Geralmente, cada diluição é inoculada 3 a 5 vezes (sendo melhor a de 5 repetições) e, por isso, a técnica se denomina de tubos múltiplos.

As combinações de tubos positivos (com crescimento) e de tubos negativos (sem crescimento) de cada uma das diluições inoculadas são analisadas estatisticamente pelo método do “Número Mais Provável” (NMP). Foram elaboradas tabelas de NMP para combinações de 3 diluições com 3 tubos cada uma (NMP de 9 tubos) ou para combinações de 3 diluições com 5 tubos cada uma (NMP de 15 tubos).

A técnica original foi desenvolvida para quantificar pelo menos um coliforme em 100 mL. Para água potável, inoculam-se alíquotas de 10 mL, de 1 mL e de 0,1 mL repetindo a inoculação da cada alíquota três ou cinco vezes. Se for para esgoto, deverão ser inoculadas alíquotas menores da amostra (diluições decimais da amostra original: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 1/100.000, etc.) em tubos individuais repetidas três ou cinco vezes com meio de cultura em quantidades e concentrações apropriadas.

Tempos atrás, usavam-se para água potável séries de 9 tubos, sendo 3 para cada alíquota (3x10 mL; 3x1 mL; 3x0,1mL ou diluições maiores), mas estas séries já não são recomendadas, pelos altos erros nos resultados. São mais utilizadas as séries de 15 tubos e, em geral, para alimentos.

As combinações de tubos positivos (apresentam crescimento – turbidez e gás) e de tubos negativos (sem crescimento, sem turbidez e sem gás) de cada uma das diluições inoculadas são analisadas estatisticamente pelo método de número mais provável (NMP). Atualmente se usam séries de 15 tubos (5x10 mL, 5x1mL, 5x0,1mL) e não mais de 9 tubos.

Entretanto, para água potável, o método de 15 tubos já não é mais recomendado, visto que o volume total submetido ao teste é de 55,5 mL e pelas normas internacionais o volume mínimo de água potável a ser analisado deve ser de 100 mL. Pode-se, então, fazer uma série de tubos múltiplos para água potável de 10x10 mL ou 5 x 20mL.

O método de tubos múltiplos pode ser usado para quantificar qualquer tipo de bactéria porque a capacidade de selecionar o microrganismo a ser quantificado reside nos meios de cultura escolhidos e da temperatura de incubação. Podem ser testadas amostras de águas de esgotos, resíduos sólidos, alimentos, etc.

A forma de expressão dos resultados é, por exemplo:

Nº de microrganismos NMP/100 mL = 230 NMP coliformes totais/100 mL

Meios de cultura para coliformes totais

Caldo lauryl tryptose adicionado de púrpura de bromocresol;

Caldo Verde Brillhante Bilis 2% - CVBLB;

Meio Endo-Less Ágar.

Técnica de Tubos Múltiplos para Coliformes Totais

A técnica de tubos múltiplos foi desenvolvida para detectar coliformes totais partindo da base de que é necessária a presença de um único coliforme no inóculo introduzido no meio de cultura para que ocorra crescimento.

A técnica é realizada em três etapas: presuntiva, confirmativa e final ou completa.

As alíquotas da água a ser quantificada, ou suas diluições, são inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura Caldo Lauryl Tryptose estéril, caldo lactosado ou similar. A partir desses tubos com o inóculo da amostra de água, procede-se da seguinte forma:

1 - Fase Presuntiva – As alíquotas da água a serem quantificadas, ou suas diluições, são inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura Caldo Lauryl Tryptose estéril, caldo lactosado ou similar. Esses tubos são incubados a 37°C / 24 a 48h (os tubos positivos com turbidez e gás contêm presuntivamente coliformes totais). Aqueles tubos que são negativos, após as 24 horas, ficam mais 24 horas na estufa.

2 - Fase Confirmativa – dos tubos positivos da etapa anterior, repica-se com alça bacteriológica estéril a cultura do Caldo Lauryl Tryptose para Caldo Verde Brilhante Bilis 2% - CVBLB 2% , para a confirmação da presença de coliformes totais.

3 - Fase Completa – reconfirmação de coliformes totais pela inoculação do crescimento nos tubos de VBB 2% em meio Endo Less Ágar no qual se formarão colônias vermelhas com brilho verde metálico, típicas de coliformes totais ou em MacConkey Ágar, onde se formarão colônias cor-de-rosa intensa ou em meio líquido com substrato definido (MUG) que muda de amarelo suave para amarelo intenso.

Procedimento Geral para Quantificar Coliformes Totais

Inicialmente, preparam-se os meios de cultura seguindo as indicações do fabricante. Para a fase presuntiva, os meios de cultura são: Caldo Lactosado ou Caldo Lauryl Tryptose adicionado de púrpura de bromocresol.

Qualquer um dos meios de cultura poderá ser usado. Distribui-se em tubos de ensaios o meio (10 mL de caldo em cada um de 15 tubos) e coloca-se dentro dos tubos de ensaio, junto com o meio de cultura, tubos de Durham invertidos, onde ficará retida parte do gás (H_2 e CO_2) produzido na fermentação do substrato, a lactose.

Os tubos de ensaio com meio de cultura são colocados em grades. As tampas são verificadas e cobertas com papel metálico para evitar que os tampões fiquem molhados ao serem autoclavados. Cada um dos tubos será etiquetado com: origem da amostra, data e hora de coleta, dia do teste, volume inoculado e hora de início da incubação. Pode-se colocar apenas um número no tubo e registrar no caderno do laboratório as referências de cada tubo com esse número e as informações consideradas necessárias. Esterilizam-se em autoclave a $121^\circ C$ durante 15 a 20 minutos.

Para detectar e quantificar coliformes totais de água potável, devem ser inoculados:

10 mL da amostra, 1 mL e 0,1 mL (cada uma com repetições em 5 tubos) ou 10×10 mL ou 5×20 mL de água.

Para inocular 10 mL de amostra de água em cada tubo sem alterar a concentração dos ingredientes do meio, deverão ser preparados, na fase presuntiva, tubos com 10 mL do meio de cultura em concentração dupla. Já nos outros tubos onde serão inoculados volumes de 1 mL e de 0,1 mL, a concentração do meio de cultura deverá ser simples.

Todos os tubos com meio de cultura devem ser esterilizados em autoclave a 121°C durante 15-20 minutos e devem ser guardados à temperatura ambiente, por um tempo máximo de 20 dias. Não devem ser guardados na geladeira porque o frio facilita a formação de bolha de gás na incubação posterior e poderão ser registrados como tubos positivos, embora falsos positivos.

Fase Presuntiva

O meio de cultura Caldo Lauryl Triptose com púrpura de bromocresol, embora um pouco mais caro que o Caldo Lactosado, é mais prático. O púrpura de bromocresol é um indicador de pH de cor lilás em pH neutro, e amarelo em condições ácidas. Serve para facilitar a leitura dos tubos positivos (serão de cor amarela) e se pode eliminar o tubo de Durham. Esse meio contém também Lauryl Sulfato que inibe consideravelmente o crescimento da biota acompanhante.

Os tubos positivos se diferenciam dos negativos porque os últimos apresentam o meio de cultura cor púrpura transparente, enquanto nos tubos positivos o meio de cultura apresenta-se amarelo e turvo devido às bactérias em suspensão que se reproduzem em seu interior.

Se for usado Caldo Lactosado, que é amarelo-claro recém-preparado, os tubos positivos serão de cor amarela mais forte, terão aspecto turvo e bolhas de gás no interior do tubo de Durham.

Recomenda-se adquirir o meio de cultura pronto de marca comercial conhecida com registro de qualidade. Eles são vendidos em pó e se reidratam com água destilada.

Componentes do Meio Caldo Lauryl Triptose

Tryptose	20,0g
Lactose	5,0g
K ₂ HPO ₄	2,75g
KH ₂ PO ₄	2,75g
NaCl	5,0g
Sodium lauryl sulfate	0,1g
Água destilada	1000 mL

Os ingredientes (pó) são misturados com água destilada e essa mistura é aquecida para dissolução do soluto. A seguir, esse meio de cultura é distribuído nos tubos em volumes de 10 mL com tubos de Durham em posição invertida no interior, e estes são esterilizados por 15 minutos a 121°C. O pH deve ser de 6,8±0,2. Adiciona-se ao meio 0,01 g/L de púrpura de bromocresol, que indicará a produção de ácido ao passar para a cor amarela, positivamente o resultado nesta parte do teste. A seguir, apresentam-se, na Tabela 1, informações para preparação do meio de cultura Lauryl Triptose, da fase presuntiva, em diferentes concentrações de acordo com o volume de amostra a ser inoculado.

Tabela 1 - Preparação do meio de cultura Lauryl Triptose em diferentes concentrações de acordo com o volume de amostra de água a ser inoculado

Inóculo da amostra de água (mL)	Total (mL) de meio de cultura no tubo de ensaio	Volume do meio + inóculo (mL)	Quantidade do meio de cultura a ser pesado (g/L)
1	10 ou mais	11 ou mais	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

Fonte: Autoras.

A quantidade de amostra a ser utilizada depende da qualidade e características da água. Para água potável, como já foi citado, podem-se usar 5 tubos para 10 mL, 5 tubos para 1 mL e 5 tubos para 0,1 mL (embora não atinja o volume recomendado de 100 mL, pode ser útil para algum dado que não faça parte da rotina de controle sistemático da qualidade da água) e, para água não potável, pode-se usar sem restrições o teste de tubos múltiplos de 15 tubos, ou seja, 5 tubos para cada volume e suas diluições de 1; 0,1 (10^{-1}); 0,001 (10^{-2}), 0,001 (10^{-3} mL), etc.

Inoculação dos tubos da fase presuntiva e incubação

Para inocular os tubos, deve-se agitar a amostra vigorosamente e transferir, para cada tubo da primeira série de 5 tubos, 10 mL da amostra (recomenda-se agitar a amostra após cada inoculação e antes da próxima). Na segunda série, será inoculado em 5 tubos, 1 mL da amostra, e na terceira série 0,1 mL em cada um dos 5 tubos e/ou as diluições subsequentes em ordem decimal. Deve-se utilizar pipeta estéril para cada nova diluição a ser inoculada e as pipetas usadas devem ser mergulhadas em um recipiente com desinfetante. Misturar, depois de inoculadas, cada uma das diluições, suavemente, por agitação, cuidando de não molhar o tampão de algodão ou qualquer tipo de tampa que for usada e de não gerar bolhas de ar que podem entrar nos tubos de Durham e dificultar a leitura posterior. Incubar os tubos inoculados a $35 \pm 0,5$ por 24h.

Após esse tempo, observar em cada tubo se houve crescimento, produção de gás e produção de ácido. Se não houver produção de gás ou reação ácida, reincubar e reexaminar após as próximas 24 horas (tempo total de incubação para esses tubos: 48 ± 3 h). A ausência de reação ácida após esse tempo

constitui um teste negativo com ou sem gás (alguns poucos coliformes são anaerogênicos). Cada tubo positivo deve ser submetido à fase de confirmação.

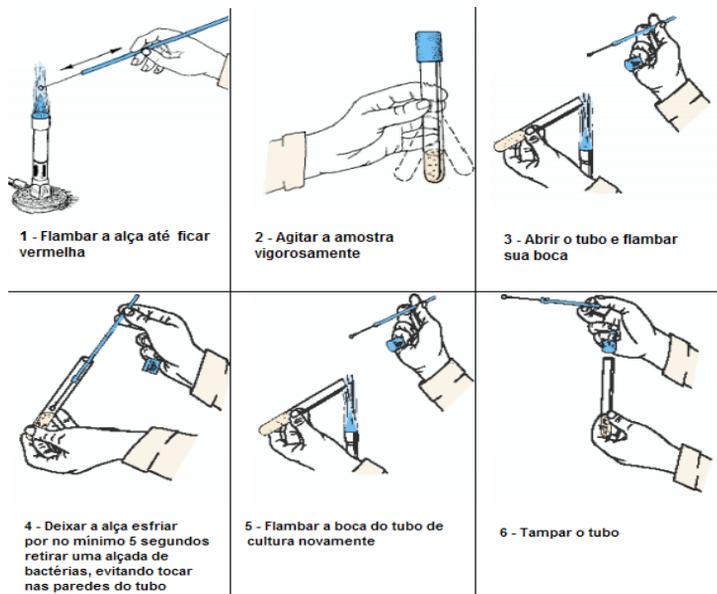
Fase de Confirmação ou Fase Confirmativa

Para coliformes totais: Imediatamente depois de efetuada a leitura dos tubos no final da fase presuntiva, deve-se homogeneizar, de forma suave, os tubos positivos para resuspender os microrganismos que sedimentaram. Com alça bacteriológica estéril, transferem-se uma ou duas alíquotas do tubo positivo para um tubo com meio Caldo Verde Brilhante Bilis 2% - CVBLB. Etiquetar esse tubo com CVBLB com os mesmos dados do tubo presuntivo correspondente, trocando apenas a data. Incubar a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas. A produção de gás e a turbidez significam reação positiva e confirmam a presença de coliformes. Também devem ser considerados positivos os tubos sem gás, e todos serão submetidos ao teste completo. A leitura final da combinação de tubos positivos e negativos gera o código para entrar na tabela de NMP para calcular a concentração de bactérias coliformes totais em 100 mL de amostra.

Para coliformes termotolerantes: este grupo de coliformes pode ser determinado de forma simultânea com os coliformes totais, a partir da fase confirmativa em CVBLB 2%. Para isto, a partir de tubos positivos da fase presuntiva, faz-se a transferência simultânea de uma ou duas alças bacteriológicas (Figura1) para tubos contendo o meio caldo EC (específico para coliformes termotolerantes) e para o CVBLB 2% (para investigação de coliformes totais). Os tubos inoculados com EC devem ser incubados a $44,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, de preferência em banho-maria com recirculação de água, para garantir que todos os tubos recebam a mesma temperatura.

Alguns pesquisadores recomendam fazer a transferência para Meio EC somente dos tubos CVBB 2% positivos, ou seja, depois de confirmada a presença de coliformes totais.

Figura 1 - Metodologia para a inoculação de tubos de ensaio com alça bacteriológica



Fonte: Cerqueira e Sant'anna (2007).

Meio de Cultura - Verde Brillante BÍlis 2% - CVBB 2%

Este meio será utilizado na fase confirmativa do grupo coliformes totais, onde serão considerados positivos os tubos com crescimento e com ou sem produção de gás.

Composição do meio

Peptona	10,0g
Lactose	10,0g
Oxgall (Bilis)	20,0g
Verde Brillhante	0,0133g
Água Destilada	1 L

Adicionar os ingredientes à água destilada. Dissolver. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,2$. Distribuir em tubos de ensaio contendo tubos de Durham em posição invertida no seu interior, até cobrir os mesmos. Tampar e autoclavar a 121°C durante 10 minutos.

Este meio de cultura é vendido pronto por várias marcas comerciais, e sua compra é recomendada em vez de realizar sua preparação no laboratório, por serem menos variáveis a quantidade e a qualidade de seus componentes. O meio é utilizado para a determinação de coliformes totais em amostras de água e de alimentos.

Para amostras de águas poluídas ou residuais que apresentarem tubos presuntivos positivos, devem-se submeter à fase de confirmação os tubos de mais alta diluição que foram positivos de até 48 h de incubação.

Fase Completa

Essa fase visa eliminar os resultados falso-positivos, que podem ocorrer no Caldo Verde Brillhante Bilis 2% devido à ação sinérgica de diferentes bactérias. Inclui a realização de ensaios presuntivos e confirmativos e deve ser feito em 10% dos tubos positivos da fase confirmativa.

A partir de um tubo positivo, procede-se à inoculação com alça bacteriológica para um meio sólido (Ágar de MacConkey, Ágar Eosina Azul de Metileno ou Ágar LES Endo),

utilizando-se sementeira em estrias para obter colônias isoladas (Capítulo 5). Repetir o procedimento com 10% dos tubos positivos em CVBB 2%.

Essa placa de Petri se incuba a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas, e as colônias que se formam devem ser típicas de coliformes:

- no meio Ágar LES Endo, as colônias típicas são de cor rosa para vermelho escuro ou roxo intenso, cobertas de um brilho verde metálico forte;
- no meio Ágar de MacConkey, as colônias típicas são de cor rosa intensa ou vermelhas e bordas lisas e podem ser circundadas por uma zona opaca de bile precipitada (Figura 2)
- as colônias típicas no meio Ágar Eosina Azul de Metileno são nucleadas, escuras, com ou sem brilho metálico (Figura 3).

De cada placa de Petri, retirar, com alça ou agulha estéril, uma ou mais colônias típicas bem isoladas, e inocular em Caldo Lauryl Triptose e em Ágar Nutriente. Visualizar a produção de gás e turbidez após 24 ± 2 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (ou $48 \pm 3\text{h}$) no Caldo Lauryl Triptose. No Ágar Nutriente, semear uma ou mais colônias típicas para serem submetidas à coloração de Gram para a confirmação microscópica da morfologia e da composição química de sua parede celular (visualizar as bactérias em forma de bastonete ou de bacilo, Gram-negativas que são de cor rosa e não esporuladas). Com esses testes, conclui-se pela confirmação da presença de bactérias do grupo coliforme na amostra. Com os dados obtidos, calcular o NMP de coliformes totais (ver cálculos).

Meios de Cultura

LES Endo Ágar

Este meio será utilizado para inoculação de crescimento bacteriano vindo do meio Verde Brilhante BÍlis, a fim de observar o crescimento de colônias típicas confirmativas de coliformes – teste completo.

Composição do meio

Casitone ou tripticase	3,7g
Thiopeptone ou thiotone	3,7g
Triptose	7,5g
Lactose	9,4g
K_2HPO_4	3,3g
KH_2PO_4	1,0g
NaCl	3,7g
Desoxicolate de sódio	0,1g
Lauril sulfato de sódio	0,05g
Na_2SO_3	1,6g
Fucsina básica	0,8g
Ágar	15,0g
Água destilada	1 L

Misturar os ingredientes dissolvendo a temperatura de 45 - 50°C, sem deixar ferver. Não esterilizar em autoclave, pH final $7,2 \pm 0,2$. Colocar 2 – 3 mL nas placas de Petri pequenas de 47 mm de diâmetro ou 10 a 15 mL nas placas de 90 mm, acondicionar em bolsas plásticas no refrigerador ou em caixas plásticas de feche hermético. Viável por 2 semanas. Preferentemente adquirir o meio pronto de marca conhecida.

O meio de MacConkey pode também ser utilizado para inoculação de bactérias a partir do meio Verde Brilhante BÍlis, a fim de observar o crescimento de colônias típicas de coliformes. Nesse meio, as bactérias fermentadoras de lactose formam colônias lisas cor-de-rosa e assim se conclui com o teste completo.

Composição do Meio de MacConkey

Peptona 17 g
Proteosa peptona 7 g
Lactose 10 g
Na Cl 5g
Ágar 13,5 g
Vermelho neutro 0,03 g
Cristal violeta 0,001g
Água destilada 1L

Adicionar os ingredientes na água, misturar e esquentar até fervura para dissolvê-los. Esterilizar na autoclave por 15 min a 121°C. Distribuir nas placas de Petri (100 x 15 mm). O pH deve estar $7,1 \pm 0,2$ após esterilização. Preferentemente adquira o meio pronto de marca conhecida.

A Figura 2 mostra uma Placa de Petri com meio MacConkey de crescimento de colônias típicas de coliformes.

Figura 2 - Placa de Petri com MacConkey Ágar e crescimento típico de colônias de coliformes. A cor rosa mais forte das colônias é devido à fermentação da lactose pelas bactérias.



Fonte: Mara (1974).

Ágar Nutriente

Este meio é utilizado para inocular as culturas estoque, e as que serão submetidas aos testes enzimáticos e à coloração de Gram.

Composição do meio

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

Dissolver os ingredientes na água, aquecendo suavemente. Distribuir em tubos de ensaio volumes de 5 mL. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Tirar da autoclave ainda quente e deixar solidificar em posição inclinada.

Meio EMB – Eosina Azul de Metileno

Este meio pode ser também utilizado para inoculação de bactérias crescidas no meio Verde Brillhante Bilis 2%, a fim de observar o crescimento de colônias típicas.

Composição do meio

Peptone	10,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Lactose	5,0 g
Sucrose	5,0 g
Eosina	0,4 g
Azul de Metileno	0,07 g
Ágar	13,5 g
Água Destilada	1000 mL

Dissolver os ingredientes na água aquecendo suavemente. Não deixar atingir ebulição. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm X 100 mm. Preferentemente adquirir o meio pronto de marca conhecida.

O grupo dos coliformes termotolerantes é detectado junto aos coliformes totais, a partir da fase confirmativa em CVBB 2%, como explicado acima. Para isto, procede-se da seguinte maneira:

- A partir de tubos positivos da fase confirmativa em CVBB 2%, procede-se à transferência de uma ou duas alíquotas com alça bacteriológica estéril para tubos contendo o meio caldo EC.
- Os tubos inoculados com EC devem incubar-se a 44,5 °C, durante 24 horas. Se for usado banho-maria em vez de estufa, deve-se manter a água acima do nível do meio de cultura dentro dos tubos (preferir

banho-maria com recirculação de água, para garantir que todos os tubos recebam a mesma temperatura).

A presença de turbidez e a produção gás neste meio indicam a presença de coliformes termotolerantes.

Meio EC

Utilizado para inoculação de culturas vindas do teste confirmativo (Caldo Verde Brilhante Bilis 2%) para identificação de Coliformes Termotolerantes.

Composição de meio

Triptose ou tripticase	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sais Biliares N° 3	1,5 g
H ₂ HPO ₄	4,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NaCl	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os ingredientes na água. Ajustar o pH para $6,9 \pm 0,2$. Distribuir em tubos de ensaio contendo tubos de Durham em volume adequado para cobrir este tubo pequeno. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Inocular os tubos com alça a partir do verde brilhante. Verificar tubos positivos e negativos respeitando a diluição original do inóculo em caldo lactosado. Com os dados obtidos, calcular o NMP de coliformes termotolerantes. Preferir meios de cultura prontos de marcas comerciais reconhecidas. Para diferenciar com segurança e rapidamente *E. coli* a partir dos tubos positivos de EC, usa-se o meio cromogênico EC-MUG.

Meio EC-MUG

Este meio será utilizado para confirmação das *E. coli* pela produção de fluorescência quando se ilumina com luz UV (λ 366 nm). Para identificar a presença de *E. coli*, deve-se transferir uma ou duas alças da cultura positiva nos tubos do teste confirmativo Verde Brilhante Bilis para o meio EC-MUG e incubar em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas, mantendo o nível da água ou temperatura homogênea na estufa. Observar os tubos e aqueles em que houve crescimento (turbidez) submetê-los à luz UV (λ 366 nm). A presença do brilho azul fluorescente é uma resposta positiva para *E. coli*.

Quando se deseja quantificar coliformes termotolerantes e confirmar a presença de *E. coli* numa mesma amostra, deve-se usar o meio EC-MUG para tubos múltiplos considerando que, neste meio, a presença de cor amarela intensa indica coliformes termotolerantes. Os mesmos tubos positivos para coliformes termotolerantes ao serem observados com luz UV (λ 366 nm), se apresentarem fluorescência azul são também positivos para *E. coli*. A combinação de tubos positivos e negativos permite entrar na tabela de número mais provável (NMP) para coliformes termotolerantes e para *E. coli*.

E. coli é o único coliforme que produz a enzima β -glucuronidase que lhe permite metabolizar parte da molécula MUG e produzir fluorescência. MUG é a sigla do composto 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo, molécula sintética e marcada com a substância luminescente no fragmento 4-metilumbeliferil. A enzima β -glucuronidase cliva o MUG em seus dois componentes: 4-metilumbeliferil e o β -d-glucorinídeo. Este último composto é assimilado e metabolizado pela *E. coli* enquanto o primeiro fica livre no meio e expressa sua marca de bioluminescência ao ser iluminado com UV (λ 366

nm). Maiores detalhes sobre o uso de substratos cromogênicos definidos podem ser obtidos no Capítulo 11 deste manual.

A determinação de *E. coli* em amostras de água potável é obrigatória na legislação brasileira (Portaria 2914/2011-MS – BRASIL, 2011) (ver cálculos).

Cálculos e Expressão dos Resultados

A densidade ou concentração de coliformes na amostra é expressa como NMP de coliformes por 100 mL, número este obtido com tabelas que contêm os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado. O número de tubos e o volume da amostra selecionada dependem da qualidade e das características gerais da água a ser examinada.

Para água potável, são usados 5 tubos com volume de 20 mL, 10 tubos com 10 mL ou simplesmente 100 mL da amostra para verificar ausência-presença.

Para água não potável, podem ser realizadas diluições consecutivas, dependendo do grau de poluição. O método que foi aceito internacionalmente, durante muito tempo, admite a repetição de cada diluição 5 vezes, analisando-se um mínimo de 3 diluições decimais consecutivas (10 mL; 1,0 mL; 0,1 mL volumes da amostra ou 1, 0,1 e 0,01 mL ou 0,01, 0,001, 0,0001 mL, etc.) que em seu conjunto analisam 55.5 mL de água. Quanto maior for o número de tubos inoculados para cada diluição, menor será o erro. Atualmente, a série de 15 tubos com 5 x 10 mL; 5 x 1 mL e 5 x 0,1 mL não é permitida na rotina laboratorial de controle da qualidade bacteriológica da água potável, porque é exigida internacionalmente a análise de um volume mínimo de 100 mL de água. Pode ser substituído por 5 tubos com 20 mL de amostra cada um.

Tabela 2 - NMP e limites de confiança para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando se usam cinco tubos contendo 20 mL da amostra

Nº de tubos com reação positiva de um total de 5 contendo cada um 20 mL de amostra	NMP / 100 ml	95% Limite de Confiança (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	> 8,0	4,0	- (infinito)

Fonte: APHA – AWWA - WPCF (2012).

Interpretação dos resultados:

Ex.: Se dos 5 tubos inoculados, 3 forem positivos, então o NMP é 4,6 NMP/ 100 mL.

Tabela 3 - NMP e limites de confiança para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando se usam dez tubos contendo 10 mL da amostra

Nº de tubos com reação positiva em 10 com 10 mL de amostra	NMP / 100 mL	95% Limite de Confiança (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5

10	> 23,0	13,5	- (infinito)
----	--------	------	--------------

Fonte: APHA – AWWA - WPCF (2012).

Interpretação dos resultados:

Ex.: Se dos 10 tubos utilizados, 3 forem positivos, o NMP é: 3,6 NMP/ 100 mL.

Para avaliar os resultados de amostras que foram inoculadas em 15 tubos, com volumes de 10,1 e 0,1 mL com 5 repetições de cada volume (5 x 10 mL, 5 x 1 mL e 5 x 0,1 mL), deve-se proceder da seguinte forma:

- Para os volumes 10 mL, 1 mL e 0,1 mL, inoculados 5 vezes cada um, anota-se o número de tubos positivos de cada série, verifica-se a combinação para os tubos positivos no Quadro 1 e se procede a ler o NMP na coluna correspondente.

Exemplo: Considerando três diluições e a inoculação de três séries de cinco tubos, para amostra de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL, no Quadro 1, podem-se obter os seguintes resultados:

Quadro 1 - Utilização de três diluições e a inoculação de três séries de cinco tubos, para amostra de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL

Diluições	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
10 mL	+	+	+	+	+
1 mL	+	+	-	+	-
0,1 mL	+	-	-	+	-

Fonte: Mara (1974).

Anotam-se: 10 mL: 5 tubos positivos; 1 mL: 3 tubos positivos; 0,1 mL: 2 tubos positivos.

A combinação de tubos é: 532, número este também denominado “código”.

O NMP será obtido diretamente a partir do Quadro 2, e o resultado é 140 NMP/100 mL.

Quadro 2 - NMP - Combinação de resultados positivos quando são utilizados cinco tubos para as diluições com 10 mL; 1 mL; 0,1 mL (continua)

Combinação de positivos	NMP/ 100 mL	Limite de Confiança 95%		Combinação de Positivos	NMP/ 100 mL	Limite de Confiança 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
				4-2-0	22	9,0	56
0-0-0	< 2	-	-	4-2-1	26	12	65
0-0-1	2	1,0	10	4-3-0	27	12	67
0-1-1	2	1,0	10	4-3-1	33	15	77
0-2-0	4	1,0	13	4-4-0	34	16	80
				5-0-0	23	9,0	86
1-0-0	2	1,0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1,0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2,0	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3,0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
				5-5-0	240	100	940
4-0-0	13	5,0	38	5-5-1	300	100	1300
4-0-1	17	7,0	45	5-5-2	500	200	2000

4-1-0	17	7,0	46	5-5-3	900	300	2900
4-1-1	21	9,0	55	5-5-4	1600	600	5300
4-1-2	26	12,0	63	5-5-5	1600	-	-

Fonte: APHA – AWWA - WPCF (2012).

Este quadro é utilizado para amostras de águas tratadas e brutas quando são utilizados 5 tubos de 10 mL, 5 tubos de 1 mL e 5 tubos de 0,1 mL e diluições maiores.

Para amostras de águas mais contaminadas, devem-se preparar diluições mais altas, por exemplo, 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ou ainda maiores.

Quando são utilizadas três séries de 5 tubos com diluições decimais diferentes daquelas indicadas na Tabela (por exemplo 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), calcula-se o NMP segundo a fórmula abaixo:

NMP correspondente ao código (para 10 mL, 1 mL e 0,1 mL) x 10 (maior volume inoculado selecionado para compor o código)

Ex.1: Considerando os volumes de 100 ml, 10 ml e 1 ml e tubos positivos de 5, 4 e 0 respectivamente, a combinação na tabela é 540, e o NMP correspondente é 130.

Aplicando a fórmula = $(130 \times 10)/100 = 13$ NMP/100 mL

Ex. 2: Considerando a inoculação de 1 ml, de 1ml da diluição 10^{-1} e 1 ml da diluição 10^{-2} e resultados positivos nos 5 tubos de 1 ml e nenhum nas outras duas, a combinação é 500, e o NMP na tabela é 23. Mas como foram feitas diluições, deve-se fazer o cálculo:

Aplicando a fórmula = $(23 \times 10)/1 = 230$ NMP/100 mL

Ex. 3: Considerando a inoculação de 1 ml de cada uma das seguintes diluições: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , os resultados mostram 5 tubos positivos para 10^{-2} , 4 para 10^{-3} e 0 para 10^{-4} , na tabela, essa combinação é 540 corresponde ao NMP 130. Calculando a concentração real para as diluições usadas:

Aplicando a fórmula = $(130 \times 10)/10^{-2} = 13 \times 10^4$ NMP/100 mL

Quando são inoculados mais de 3 volumes decimais (10; 1; 0,1 e 0,01 mL), utilizam-se para a busca do NMP, na tabela, apenas os resultados positivos de três séries consecutivas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será aquele da série de menor volume da amostra (maior diluição), na qual todos os tubos apresentaram resultados positivos e desde que tenham sido inoculadas diluições decimais seriadas para totalizar os três algarismos para o código. Logo, o NMP lido na tabela é submetido ao cálculo para obter o resultado de acordo com as diluições e será obtido com a fórmula a seguir:

Valor do NMP para as diluições (10, 1 e 0,1) da tabela $\times 10$ (maior volume inoculado e selecionado para compor o código)

Ex. 1: Considera-se agora a inoculação de 10 ml em 5 tubos, 1 ml de 10^{-1} em outros 5, a seguir, 1 ml de 10^{-2} em outros 5 tubos, assim sucessivamente para 1 ml de 10^{-3} e 1 ml de 10^{-4} . Os resultados foram: 5 tubos positivos para 10 ml, 5 para 10^{-1} , 2 para 10^{-2} , 1 para 10^{-3} e 1 para 10^{-4} . A maior diluição com todos os tubos positivos foi 10^{-1} . E as duas diluições subsequentes foram 10^{-2} com dois tubos e 10^{-3} com 1 único tubo. Portanto, combinação igual a 521, o qual corresponde na tabela ao NMP 70. Para obter o real NMP em 100 ml da amostra, aplica-se a fórmula, a seguir, levando em consideração o maior volume inoculado (ou seja, a menor diluição).

Aplicando a fórmula para o maior volume inoculado: =
 $(70 \times 10)/10^{-1} = 7 \times 10^5 \text{ NMP}/100 \text{ ml}$

Ex. 2: Considerando a inoculação de 1 ml de 10^{-1} , de 1ml de 10^{-2} e, assim, sucessivamente para 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , os resultados foram: 5 tubos positivos da primeira diluição, 5 da segunda, 5 da terceira, 2 da quarta e 0 da quinta. A combinação ou código de entrada na tabela é 520 (a maior diluição com todos os tubos positivos foi 10^{-3} com 5 tubos positivos). Para esse código 520, a tabela mostra NMP de 49.

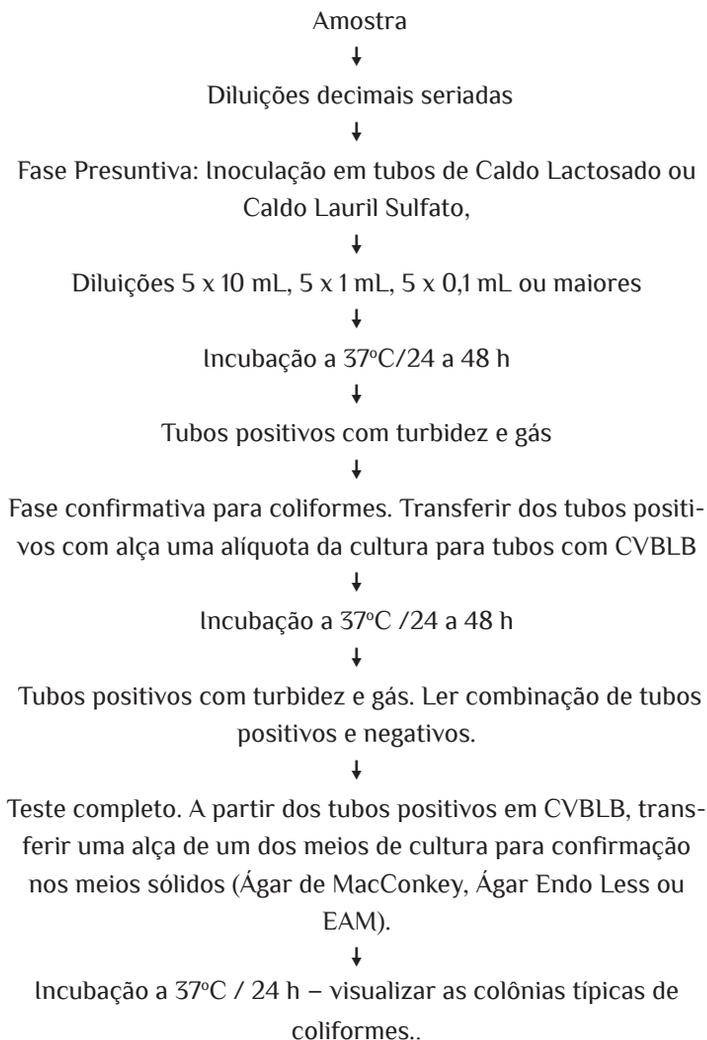
Aplicando a fórmula para o maior volume inoculado:
 $= (49 \times 10)/10^{-3} = 4,9 \times 10^5 \text{ NMP}/100 \text{ ml}^3$

Se a combinação não for encontrada na tabela, o NMP estimado pode ser calculado com equações específicas, mas destaca-se que quando várias amostras apresentam combinações positivas inexistentes na tabela, a causa é, em geral, um erro de inoculação ou de agitação da amostra, sendo melhor repetir o teste.

A seguir, apresentam-se fluxogramas das técnicas para coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*.

Fluxogramas das Técnicas de Tubos Múltiplos para Quantificação de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *E. coli*

1 - Esquema do procedimento para coliformes totais

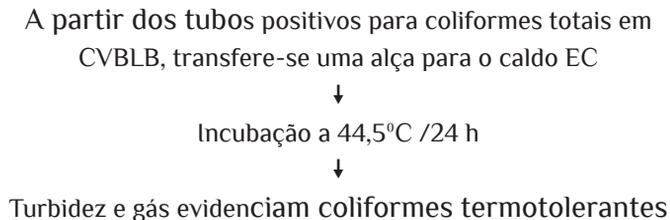


Todos os tubos positivos devem ser semeados em meios sólidos e, após o crescimento das colônias, deve-se proceder à coloração de Gram e se for necessário, aplicar testes de provas bioquímicas para a identificação dos gêneros das enterobactérias.

A lactose do caldo lactosado é a fonte de carbono das bactérias coliformes, a qual é fermentada, com produção de ácido e gás. O Lauril Sulfato pode ser adicionado ao caldo com lactosa por ser um inibidor da microbiota acompanhante.

Utiliza-se um meio de cultura com inibidores para as bactérias não coliformes ou microbiota acompanhante. O Caldo Verde Brilhante Lactose BÍlis a 2% (CVBLB) é uma boa escolha porque a bílis bovina e o corante verde brilhante funcionam como inibidores das bactérias Gram positivas, principais bactérias presentes na biota das amostras de fezes e do ambiente. A produção de gás no CVBLB indica o crescimento de bactérias Gram negativas fermentadoras de lactose como os coliformes.

2 - Esquemas do procedimento para coliformes termotolerantes



3 - Esquemas do procedimento para E. coli

Pode-se proceder de duas formas:

- a. A partir dos tubos positivos para EC inocular uma alça em meio EC-MUG

- b. Podem-se detectar, simultaneamente, coliformes termotolerantes e *E. coli* semeando as culturas positivas em CVBLB diretamente em EC-MUG. Após fazer a leitura para coliformes termotolerantes, procede-se a observar os tubos em UV (λ 366 nm) para visualizar uma fluorescência azul. Este método é mais prático e econômico que o anterior.

Referências

APHA, AWWA, WPCF. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, L. S. Clesceri (Eds.). 22th ed. Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.

CERQUEIRA, A.; SANT'ANNA, R. S. **Apostila de Aulas Práticas: Disciplina Bacteriologia**. Universidade Federal Fluminense/ Instituto Biomédico/Departamento de Biologia e Parasitologia. 2007, 80p.

MARA, D. D. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Churchill Livingstone, 1974, 209p.

CAPÍTULO 10

Técnica da membrana filtrante

A filtração é um processo de separação de um sólido particulado de um fluido, neste caso, um líquido, através de um meio poroso (a membrana), no qual, o sólido fica retido e o líquido passa por esse meio. Na filtração por membrana em microbiologia, o líquido passa por efeito da pressão de uma bomba de sucção.

É um método generalizado para separar bactérias, cianobactérias, protozoários, leveduras, fungos e outros microrganismos de matrizes ambientais (água, esgotos, lodos e solos, entre outros materiais) e proceder ao seu crescimento, identificação e quantificação.

A técnica se fundamenta na filtração de um volume conhecido da amostra líquida e de suas diluições que contêm os microrganismos a serem identificados e quantificados, através de uma membrana de acetato de celulose pura e atóxica. Essa membrana possui 45 mm de diâmetro e poros pequenos (0,22 a 0,45 mm de diâmetro) que retêm os microrganismos, de tamanhos iguais ou inferiores a 1µm, mas superiores a 0,22 µm ou 0,45 µm. Enterobactérias como *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp; *Salmonella* sp, *Shigella*, entre outras, têm tamanho médio de 1 – 1,5 x 2 a 2,5 µm e ficam retidas nos poros dessas membranas.

As bactérias que ficam aprisionadas nos poros crescem localmente na parte superior da membrana depois de

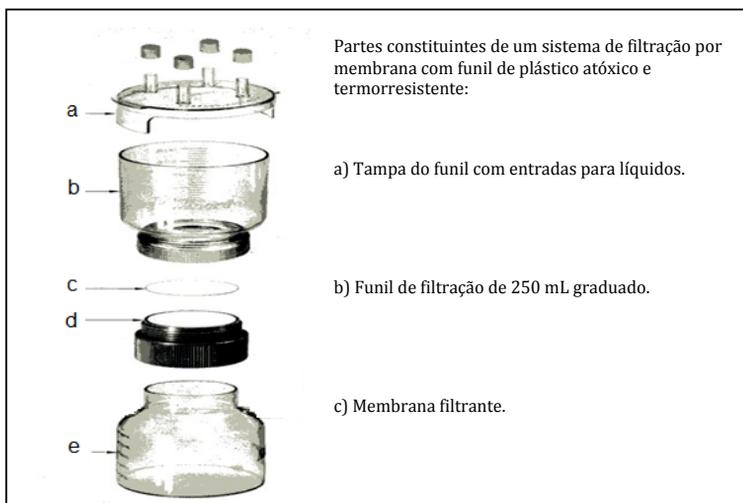
colocada numa placa de Petri com um meio de cultura que se difunde através da membrana e favorece sua multiplicação. Para estimular esse crescimento, a placa é incubada na estufa bacteriológica em posição invertida durante 24 ou 48 horas na temperatura apropriada. Ao se multiplicarem no mesmo local (ao redor do poro), as bactérias formarão uma colônia que se visualiza a olho nu. A quantificação pressupõe que em cada poro ficou retida apenas uma bactéria, ou seja, que cada colônia se formou a partir de uma única bactéria daquelas presentes na amostra original. Essas colônias são quantificadas e se procede ao cálculo do número de bactérias presentes na amostra.

Em um único poro, pode ficar aprisionada uma bactéria, duas ou mais, e estas crescerem formando uma colônia ou duas, muito próximas, que assemelham ser só uma (Figura 1). Ao quantificar, não é possível saber quantas bactérias originaram uma colônia. Dessa forma, a quantificação com todas as técnicas baseadas na contagem de colônias usa a unidade UFC (Unidades Formadoras de Colônias) referida a um determinado volume da amostra líquida, para poder calcular a densidade (UFC. mL⁻¹ ou UFC.100mL⁻¹). O volume de referência será 1 mL se foram quantificadas Bactérias Totais Heterótrofas ou Contagem Padrão (UFC.mL⁻¹) como mostrado no Capítulo 7. Para coliformes, as normas internacionais referem-se à densidade de bactérias em número de UFC.100mL⁻¹ (Capítulo 9).

A filtração é realizada com um sistema (*sistema de filtração*) constituído por um funil de filtração, suporte da membrana, tampão de polipropileno para o ajuste do filtro e do suporte de membrana e frasco receptor do líquido filtrado, que será descartado (Figura 1). Todo o sistema deve ser esterilizado antes de uso e o ambiente da bancada de trabalho deve manter condições assépticas com o bico de Bunsen aceso (às

vezes, é necessário manter ligado mais de um bico de Bunsen) ou trabalhar em câmara de fluxo.

Figura 1 - Sistema de Filtração por Membrana com Equipamento de Plástico Termorresistente



Fonte: Mara (1974).

Os funis podem ser de material plástico, de vidro ou de aço inoxidável. Esse funil é montado sobre o suporte da membrana e se ajusta por pressão ou por um sistema de rosca. O conjunto se ajusta ao frasco receptor do líquido filtrado e esse recipiente, que pode ser também um kitassato, tem uma saída para conexão à bomba.

Podem-se utilizar suportes de filtros para conectar 3 a 5 filtros em série a uma única bomba e processar várias amostras de forma simultânea, ganhando-se tempo, com menor consumo de energia.

Nas Figuras 2 a 8, observam-se filtros de diferentes qualidades (plástico, vidro, aço inoxidável) e suportes para filtros.

Citam-se os passos metodológicos do processo de filtração tais como a colocação da membrana sobre o suporte de filtração, placas de Petri de 47 mm, uma placa de Petri com “pads” ou discos absorventes estéreis para meios de culturas líquidos e uma membrana filtrante com colônias de bactérias coliformes e, por último, uma ampliação da superfície de uma membrana filtrante com bactérias de forma bacilar na superfície onde se visualiza sua posição nos poros.

Figura 2 - Filtros conectados em série em um único suporte ligado a um coletor da água filtrada e este à bomba



Fonte: MERCK/MILLIPORE (2015).

Figura 3 - Um único filtro em um suporte para três. Um suporte de funil fica aberto para receber a pressão da bomba e os outros ficam fechados para evitar a perda de pressão



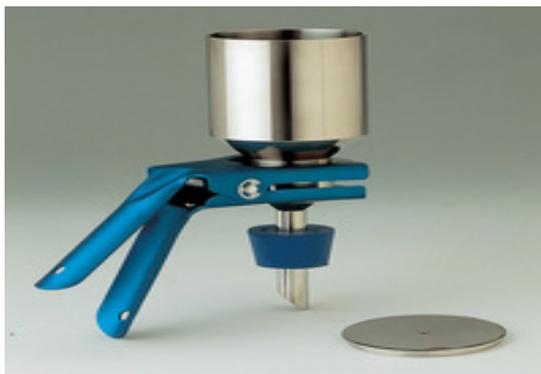
Fonte: MERCK/MILLIPORE (2015).

Figura 4 - Colocação da membrana sobre o suporte em um filtro de aço inoxidável antes da filtração. A fase quadriculada para cima



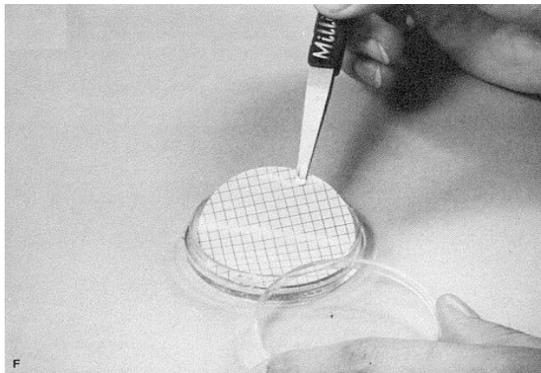
Fonte: MERCK/MILLIPORE (2015).

Figura 5 - Filtro de aço inoxidável ajustado com garra para assegurar o suporte da membrana e tampão de polipropileno azul para fixá-lo ao suporte para filtração



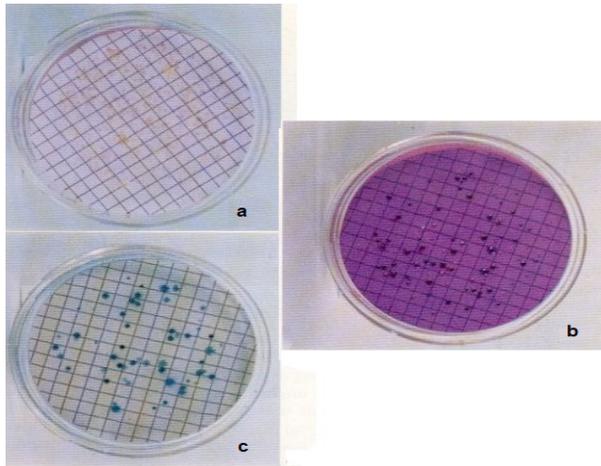
Fonte: MERCK/MILLIPORE (2015).

Figura 6 – Membrana de filtração sobre Placa de Petri de 47 mm de diâmetro com almofada (pad) para absorver meio de cultura líquido



Fonte: Mara (1974).

Figura 7 – a) Membranas com colônias de coliformes totais (amarelas) em meio Enrichment Teepol Broth; b) colônias com brilho metálico de coliformes totais em meio Endo Ágar Less e c) coliformes termotolerantes (colônias azuis) em meio m- FC Ágar



Fonte: Mara (1974).

Antes de efetuar a filtração, deve-se preparar todo o material a ser utilizado:

Os meios de cultura devem ser preparados seguindo as indicações dos fabricantes. Para isso, é pesado o pó (meio desidratado) e adiciona-se água destilada. Deve-se controlar o pH e ajustar, se for necessário, com álcali ou com ácido. A esterilização pode ser feita por fervura ou autoclave. O meio de cultura deve ser específico para a bactéria que se deseja quantificar. Esses meios podem ser sólidos (com ágar) ou líquidos.

Os meios líquidos são colocados dentro de uma placa de Petri, onde foi incluída uma almofada absorvente atóxica (“pad”), estéril adquirida pronta dos fornecedores. Os meios líquidos, depois de esterilizados, são distribuídos com pipeta estéril e ainda quentes, em pequenos volumes (2 a 2,5 mL)

dentro das placas de Petri estéreis para saturar o “pad” (sem excesso do líquido), deixando-se esfriar antes do uso. Devem ser preparados e utilizados no mesmo dia da realização da filtração ou não mais de 24 horas antes.

Os meios sólidos contêm ágar, polímero de agarose obtido de algas vermelhas, que é líquido em temperatura superior a 44°C e sólido em temperaturas iguais e inferiores a 10°C. São esterilizados por calor (fervura ou autoclavação) e se vertem ou medem com pipeta estéril volumes aproximados de 2,5 mL em cada placa de Petri plástica de 47 mm de diâmetro, estéreis e descartáveis. Podem-se, também, usar placas de Petri de vidro de 49 mm que devem ser esterilizadas antes de uso, e têm a vantagem de serem recicláveis.

As placas com os meios sólidos podem ser preservadas em geladeira durante 24 a 48 horas para os meios de cultura mais facilmente perecíveis e até 15 a 20 dias para aqueles mais duradouros como o meio mFC-Ágar, meio para coliformes termotolerantes.

Para preservar os meios de cultura durante a estocagem, as placas devem ser mantidas na geladeira dentro de uma caixa plástica bem fechada com a base para cima e um chumaço de algodão úmido dentro da caixa, para evitar a dessecação do ágar. Podem-se usar bolsas plásticas com zíper em substituição à caixa plástica.

A esterilização do funil e do suporte da membrana pode ser feita por fervura (100°C - 30 minutos), autoclave (121°C/1,5 atmosferas - 15 a 20 minutos) ou com luz UV (para os filtros de vidro e de plástico - 30 minutos). As metodologias de esterilização dos funis foram explicadas no Capítulo 7.

Para processar as amostras por membrana filtrante, utiliza-se líquido de diluição isotônico. O líquido de diluição será usado em várias etapas do processo: I) para preparar diluições seriadas decimais para amostras com elevada concentração de microrganismos que não podem ser filtradas puras; II) para

adicionar dentro do funil de filtração quando forem filtrados volumes iguais ou inferiores a 10 mL da amostra ou de suas diluições; III) para lavagem das paredes do filtro após a filtração e entre cada uma das filtrações. Deve-se preparar um líquido de diluição isotônico pH 7,0 – 7,2, que será esterilizado em autoclave. Podem ser usados diferentes tipos de líquido de diluição. Este é um líquido isotônico tamponado para regular o pH do ambiente e manter a turgência celular, ou seja, evitar a morte por desidratação (plasmólise) ou por inchaço e ruptura da célula (lise) – leveduras, bactérias, cianobactérias, algas e alguns protozoários são microrganismos unicelulares. Por falta ou excesso de sais na água para a manutenção dos processos metabólicos, a célula pode morrer rapidamente devido à perda de água (murcha) se houver maior concentração de sais no meio externo (plasmólise na água salgada). Já nos ambientes sem ou com poucos sais, a célula morre, porque a água penetra dentro da célula e esta incha e sua membrana estoura (lise celular).

Como citado no Capítulo 7, existem diversas formulações de líquidos de diluição, a mais simples e muito utilizada é a solução fisiológica salina, que consiste numa solução de NaCl 0,85% em água destilada.

Todos os líquidos de diluição devem ser esterilizados antes de uso. Devem ser preparados nas quantidades necessárias para o trabalho de 15 a 20 dias, e estocadas em volumes pequenos com preferência igual ou inferior a 500 mL em garrafas ou frascos bem fechados e em local fresco e escuro. Esses cuidados diminuem os riscos de contaminações. Uma fórmula de líquido de diluição bastante usada é da Água de Diluição Tampão Fosfato apresentada no Capítulo 7. É uma solução fosfatada salina.

Para as amostras com alta carga bacteriana, devem-se fazer diluições seriadas decimais. Para isso, no dia anterior ao teste, podem-se distribuir, sob condições de assepsia, em

tubos de ensaio estéreis, 9 mL do líquido de diluição esterilizado e se preservam todos os tubos em geladeira até o dia seguinte.

Foi escolhida a quantidade de 9 mL para que ao adicionar 1 mL da amostra se obtenha a diluição 1/10, a seguir, uma alíquota de 1 mL dessa diluição (ou seja, 0,1 mL da amostra original) é transferida com assepsia a outro tubo com 9 mL de líquido de diluição, a segunda diluição corresponde a 1/100 da amostra bruta (ou seja, 0,01 mL da amostra original) e assim sucessivamente se preparam as diluições seriadas. Por exemplo, para calcular a densidade de coliformes totais, termotolerante e *E. coli* em esgotos domésticos é necessário diluir até 10.000 ou 100.000 vezes (0,00001 mL da amostra original).

Também se pode fazer a distribuição do líquido de diluição nos tubos de ensaio antes da esterilização. Para isso, coloca-se em cada tubo um volume de $9 \pm 0,2$ mL do líquido de diluição. Esse aumento de 0,2 mL corresponde ao volume que será evaporado durante a autoclavação. Uma vez distribuído o líquido nos tubos, colocam-se os tampões de algodão ou de metal ou de plástico e se cobrem todos os tubos de ensaio com papel metálico para evitar que os tampões se molhem com o vapor da autoclave. A seguir, esterilizam-se os tubos com o líquido. Após resfriados, devem ser mantidos na geladeira e rapidamente utilizados.

Esgotos domésticos brutos têm em média 70.000.000 (7×10^7) a 900.000 (9×10^8) coliformes termotolerantes em 100 mL. Se fosse filtrado apenas um mL desse esgoto, deveriam crescer, teoricamente, na superfície da membrana, 700.000 a 900.000 colônias de coliformes. Essa quantidade de colônias não poderia se desenvolver na placa de Petri pela falta de espaço e, se crescessem, seria impossível quantificar a olho nu. As que conseguissem crescer seriam de tamanho mínimo e superpostas. Por razões de validade estatística, o número de colônias em membranas de 47 mm de diâmetro deve ser

superior a 13, e igual ou inferior a 80 para que possam se desenvolver colônias isoladas, grandes e visíveis.

Então, com amostras altamente contaminadas se procede a fazer as diluições decimais acima citadas, sob estritas condições de assepsia, em bancada previamente desinfetada com álcool 70%, o bico de Bunsen aceso e os tubos de diluição próximos à área “quente” ou se trabalha na câmara estéril de fluxo laminar. Todo o material a ser usado deve ser estéril.

Diluição seriada significa que 1 mL da amostra será diluído 10, 100, 1.000 vezes, etc., até obter as concentrações bacterianas adequadas para crescerem na membrana. No caso da amostra de esgoto citada, será necessário diluir 1 mL da amostra 10.000 vezes, ou seja, até a diluição 10^{-4} . Para isso, procede-se a fazer a primeira diluição, de 1/10 (diluição 10^{-1}). Adiciona-se 1 mL da amostra bruta em 9 mL do líquido de diluição isotônico estéril (preparado previamente em tubos também estéreis) com uso de pipeta de 1 mL estéril, após agitação intensa da amostra bruta para dissolver os flocos agregados biológicos, onde as bactérias ficam pressas.

Na diluição 10^{-1} , há 700.000 futuras colônias, ou seja, ainda é um número muito elevado. Dessa primeira diluição, após agitação do tubo, retira-se com outra pipeta estéril 1 mL e se adiciona em um segundo tubo com 9 mL de líquido de diluição. Na diluição obtida, de 1/100 (10^{-2}), haverá 70.000 futuras colônias. A terceira diluição se consegue adicionando 1 mL da diluição 10^{-2} em 9 mL de líquido de diluição, sempre usando pipeta estéril. Corresponde à diluição 1/1000 (10^{-3}) e ali haverá 7.000 futuras colônias em 1 mL, na próxima diluição, 10^{-4} ou 1/10.000, há 700 bactérias por mL. Procede-se igual às anteriores, usando como inóculo 1 mL da diluição 10^{-4} . Nessa última diluição, o número de colônias presentes em 1 mL a ser formado na superfície da membrana é de aproximadamente 70. Esse número é perfeitamente viável de ser quantificado a olho nu.

Procedimento Metodológico na Técnica de Membrana Filtrante

Material necessário:

- a. equipamento de filtração com porta-filtro estéril;
- b. placa de Petri estéril de Ø 47 mm; com cartão absorvente no seu interior se for meio líquido ou com o meio de cultura já solidificado se for meio com Ágar. Os meios de cultura serão específicos para a bactéria ser detectada (Caldo Ágar Endo Less para coliformes totais, Caldo Ágar M FC para coliformes termotolerantes, etc).
- c. filtros de membrana de Ø 45 mm e porosidade de 45µm;
- d. água de diluição estéril em frascos para uso durante a filtração e distribuída em tubos de ensaio na quantidade de 9 mL por tubo, se for necessário preparar diluições e em garrafas de 50 mL para proceder à filtração;
- e. pinça de aço inox com pontas lisas para não prejudicar a membrana;
- f. copo de aço inox com álcool para esterilizar a pinça;
- g. bico de Bunsen ou câmara de fluxo laminar;
- h. bomba de vácuo (ou seringa);
- i. estufa bacteriológica ou banho-maria.

Preparar os meios de cultura como especificado pelos fabricantes, esterilizar e distribuir nas placas de Petri como já foi explicado no Capítulo 7.

Os sistemas de filtração devem ter sido lavados, secos e esterilizados previamente por qualquer dos métodos citados no Capítulo 7.

Procede-se, a seguir, a filtração da amostra ou das suas diluições em ambiente asséptico. Os passos sequenciais (citados em detalhes no Capítulo 7) são:

- a. preparar as placas de Petri com os meios de cultura se não foram preparados no dia anterior;
- b. com a pinça previamente flambada e resfriada perto do bico de Bunsen, colocar cuidadosamente na placa de Petri um cartão absorvente se o meio for líquido e com pipeta esterilizada colocar 1,8 mL a 2,2 mL do meio de cultura no cartão absorvente e tampar a placa; se for meio sólido colocar 2 mL do meio fundido e deixar resfriar e solidificar;
- c. com a pinça flambada e resfriada, colocar a membrana filtrante no porta-filtro;
- d. agitar o frasco contendo a amostra, pelo menos 25 vezes;
- e. destampar e flambar a boca do frasco;
- f. verter, cuidadosamente, 100 mL (*) de amostra no porta-filtro (ou funil de filtração), evitando que a água respingue sobre as bordas superiores;
- g. ligar a bomba de vácuo e fazer a sucção;
- h. depois de filtrada a amostra, lavar 3 vezes as paredes do funil com água de diluição estéril com porções de 20 mL aproximadamente aplicando vácuo;
- i. após a lavagem do funil, aliviar o vácuo e remover o funil do suporte;

(*) Filtram-se diretamente 100 mL de água se for água potável, mas para outros tipos de água com diferentes níveis de contaminação se podem filtrar 10 ou 1 mL da água bruta ou 1 mL de cada uma de suas diluições decimais. Nesse caso, procede-se da seguinte forma: 1) colocar a membrana de filtração no suporte de filtro com assepsia, ajustar o funil de filtração

ao sistema; 2) adicionar dentro 30 a 50 mL de líquido de diluição estéril e a seguir a amostra igual ou menos de 10 mL; 3) misturar com rotações leves o sistema para que a amostra se misture homoganeamente com o líquido de diluição; 4) a seguir, liga-se a bomba de sucção; 5) uma vez filtrada toda a mistura líquido de diluição + amostra, procede-se à lavagem das paredes internas do funil de filtração por três vezes, como já foi explicado. Todos os equipamentos e líquidos e meios de cultura devem estar e se manter estéreis. A seguir, continua-se com os passos metodológicos.

A adição de certo volume de líquido de diluição no funil acima da membrana de filtração antes da adição da amostra objetiva gerar um ambiente líquido para que os pequenos volumes de amostras não sejam absorvidos na superfície da membrana antes de uma distribuição homogênea dessa alíquota no filtro. Isto se consegue ao adicionar antes o líquido de diluição e, depois de inoculada a amostra, procede-se a sua mistura com rotações leves. Somente depois dessa mistura se pode aplicar a sucção. Caso não se proceda dessa forma, as colônias crescerão todas juntas ao redor de uma pequena área do filtro.

- j. finalizada a filtração, transfere-se assepticamente a membrana de filtração para a placa de Petri com o meio de cultura específico e se procede à incubação.
- k. para a incubação, as placas de Petri devem ser colocadas na estufa com a base para cima e podem ser organizadas uma acima de outra em pilhas de não mais de 6 a 8 placas, para evitar que algumas não recebam a temperatura adequada. A temperatura e o tempo de incubação para esta fase dependem do microrganismo a ser isolado: 37°C para coliformes totais durante 24 h e 44,5°C para coliformes termotolerantes ou *E. coli* no mesmo tempo. Lembrar que o

número ideal de colônias para membrana de 45 µm de diâmetro é de 13 até 80 unidades. Menos de 13 colônias não há um valor estatístico e mais de 80 colônias não conseguirão crescer na membrana de 45 mm de diâmetro, sendo impossível saber a densidade total. As colônias que se desenvolvem na superfície da membrana são contadas, realizando-se o cálculo do número de colônias em 100 mL de água da amostra. Para isso, aplica-se a seguinte equação:

$$\text{Nº de bactérias/100 mL (UFC/100 mL)} = \frac{\text{número de colônias contadas} \times 100}{\text{volume filtrado} \times \text{diluição}}$$

As Figuras 9 e 10 mostram membranas com crescimento de coliformes totais, com o meio Endo Ágar Less, específico para esse grupo de bactérias e coliformes termotolerantes crescidos no meio m FC- ágar, que origina colônias azuis típicas e é próprio para esses coliformes.

Vantagens da Técnica de Membrana Filtrante

- filtra grandes volumes de água;
- resultados em 24 horas contra 72 horas dos tubos múltiplos;
- sistema de filtração simples e fácil de limpar e esterilizar.

Desvantagens da Técnica de Membrana de Filtração

- não é viável para filtrar águas com grandes volumes de sólidos suspensos (amostras com alta turbidez).

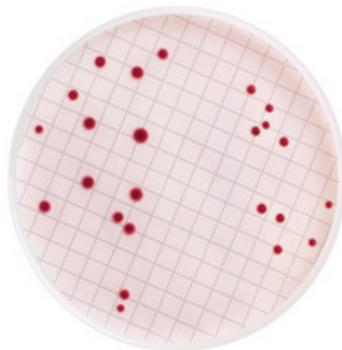
O sucesso do método depende do cuidado com que é feita a preparação e esterilização de todo o material. Lembrar das estritas condições de assepsia do lugar de trabalho e durante todo o processo de filtração, ainda a temperatura de incubação deve ser precisa, não pode haver flutuações de temperatura. Basta que a estufa atinja 6°C (0,5°C a mais da temperatura de incubação) para que os coliformes termotolerantes morram e se for inferior a 40°C ou flutue a menos de 45°C para que o teste seja comprometido.

Para o isolamento e quantificação de outras bactérias, utiliza-se o mesmo procedimento, mas os meios de cultura deverão ser específicos para esses microrganismos assim como as temperaturas de incubação apropriadas.

Para estreptococos fecais, por exemplo, utilizados como indicadores de contaminação fecal em praias, o meio é m-Enterococcus ou m-KF Enterococcus Ágar; para *Clostridium*, usa-se o meio *Clostridium perfringens* Ágar e para estafilococos, Baird Parker.

A Figura 9 mostra colônias de enterococos em meio de cultura m-Enterococcus Ágar, indicadores de poluição fecal em águas salobras e salinas, como as marinhas.

Figura 9 - Colônias de Enterococos em meio M-Enterococcus Ágar



Fonte: MERCK/MILLIPORE (2015).

O procedimento é o mesmo que para coliformes, a diferença é apenas o meio de cultura.

Referências

MARA, D. D. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Churchill Livingstone, 1974, 209p.

MERCK/MILLIPORE. **Meio m-Endo Coliformes Totais (Desidratado)**. Disponível em: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

Testes de substratos enzimáticos definidos para coliformes (testes rápidos)

As técnicas com uso de substratos definidos, também denominadas de métodos rápidos, começaram a ser desenvolvidas na segunda metade do século XX, frente à necessidade de obtenção rápida de resultados. Na época, estava ainda muito disseminada a Técnica de Tubos Múltiplos nos laboratórios das companhias de águas e esgotos e em pesquisas de microbiologia sanitária e ambiental. Essa técnica, desenvolvida nos fins do século XIX, precisa de 72 a 96 horas para a obtenção dos resultados sobre a concentração de coliformes totais e termotolerantes em uma amostra.

Um grande avanço ocorreu no início da década dos anos 70, quando se popularizou a técnica de Membrana Filtrante, que reduziu o tempo de incubação para coliformes totais para 24 horas. Entretanto, ainda eram necessárias mais 24 ou 48 horas para detectar e quantificar *Escherichia coli*.

Com a normatização e controle dos padrões de qualidade da água potável e, alguns anos depois, o início das políticas de proteção ambiental, a necessidade de aumentar a capacidade de análises dos laboratórios se tornou mais preeminente. Reduzir o tempo de processamento das amostras passava por simplificar as técnicas (uso de reagentes, meios de cultura, instrumentos, lavagem e preparação do material, etc.),

aumentar sua sensibilidade e, simultaneamente, reduzir os custos unitários frente ao grande aumento da demanda.

A aplicação de técnicas que permitem detectar enzimas específicas de uma espécie ou gênero ou de um grupo de microrganismos que agem sobre substratos definidos com propriedades cromogênicas e/ou fluorogênicas se mostrara promissora, na atualidade, está amplamente em uso. Simplificam os procedimentos analíticos ao facilitarem a detecção qualitativa e quantitativa diretamente nos meios sólidos ou líquidos.

Baseados em uma reação enzimática por ação da bactéria que produz a mudança da cor do meio de cultura ou da colônia não são necessários repiques para obter novas culturas para se proceder aos testes de identificação bioquímica de microrganismos tais como o SIM (produção de H_2S , de indol e mobilidade), TSI (fermentação de glicose, lactose, sacarose, produção de gás e H_2S na forma de sulfeto ferroso), uso de citrato, etc. Não necessitar destes testes diminui em 24 a 48 horas a obtenção dos resultados.

As metodologias de substratos definidos foram publicadas como “tentativas propostas” pela primeira vez nos métodos -padrões de 1990 e destinadas à “Análise Bacteriológica de águas para consumo humano” (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF) e já padronizadas foram publicadas na 20ª Edição, de 1998).

Teste Enzimático de Substratos Cromogênicos ONPG (β -D-galactopiranosido) e MUG (β -D-glucoronido-4-metilumbeliferona)

O teste se baseia na utilização, pelos coliformes, de um substrato cromogênico (o-nitrofenil- β - D-galactopiranosido)

incorporado no meio de cultura, que é alvo de ação da enzima β -D-galactosidase, que todos eles produzem. Essa enzima, ao agir sobre a molécula de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido libera o cromógeno orto-nitrofenol, que muda a cor do meio para amarelo intenso em 24 horas e incubação a 35 – 37°C. Dentre os coliformes, *Escherichia coli* possui, além da enzima β -D galactosidase, a enzima β -glucoronidase, que cliva o substrato β -D-glucoronido-4-metil-umbeliferona (MUG), liberando 4-metil-umbeliferona, molécula fluorescente ao ser observada com U.V (λ 366 nm), ou seja, também em 24h se dispõe da confirmação da presença de *E. coli*.

O teste determina a produção da enzima β -D-galactosidase, presente em todas as linhagens de coliformes (coliformes totais, grupo que inclui os coliformes termotolerantes e *E. coli*). A presença da enzima β -glucoronidase do *E. coli* é também determinada em 24h em amostras de água e esgotos e outros líquidos e também em alimentos.

O meio de cultura usado, denominado substrato cromogênico – MUG pode ser utilizado com as técnicas de tubos múltiplos, de Membrana de Filtração e no teste de Presença-Ausência (P/A).

Princípio do Método:

O substrato cromogênico orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) é usado para detectar a enzima β -D-galactosidase que é produzida pelas bactérias do grupo coliformes totais. Sob ação dessa enzima, o substrato é clivado liberando orto-nitrofenol que muda a cor do meio para amarelo intenso. Quando se adiciona ao meio de cultura o MUG (β -D-glucoronido-4-metil-umbeliferona), a enzima β -glucoronidase que é produzida apenas pela *E. coli* quebra a molécula liberando 4-metil-umbeliferona, que observada sob

luz UV de 366 nm produz fluorescência azul intensa. Ou seja, que após 24 horas de incubação, faz-se a leitura simultânea de Coliformes Totais e de *E. coli*.

Existem, no comércio, diversos meios de cultura com MUG, nas formas líquidas (caldos) e sólidas (com Ágar).

Técnica COLILERT®

A IDEXX é a distribuidora da marca COLILERT®, que oferece os produtos para venda separados ou em um kit. O uso do kit é muito fácil e altamente prático, em especial, quando se devem analisar diariamente numerosas amostras. Tal situação ocorre em todas as companhias de água e esgotos que devem controlar a qualidade da água fornecida em diversos pontos da rede de distribuição. Situação parecida ocorre com o programa do SUS de controle da qualidade bacteriológica da água em comunidades da zona rural. Também é prático para pesquisas de campo e em laboratório.

Embora desenvolvido originalmente para análises de coliformes em águas, tem ampla aplicação na detecção e quantificação de coliformes totais e *E. coli* em amostras líquidas de diferentes origens tais como solos, lodos e alimentos, entre outras.

O kit oferece sacos de plástico estéreis com tiosulfato de sódio para eliminar o cloro residual da água potável e com a marca para coletar 100 mL de amostra ou frascos de coleta estéril também com a marca indicando 100 mL. O meio de cultura em pó é fornecido em cartelas plásticas, já esterilizado. A cartela possui ampolas plásticas individuais de fácil abertura com a quantidade de meio estéril adequada para ser adicionada diretamente a 100 mL da amostra de água. Cada um dos componentes do kit pode ser adquirido por separado.

Para a execução do teste, o meio de cultura é dissolvido diretamente na amostra. Permite, em 18 horas ou menos, a determinação simultânea da presença-ausência (P/A) de coliformes totais e *E. coli*, altamente importante em situação de calamidade pública.

Pode ser usado para teste qualitativo (P/A) como citado acima, apropriado para águas potáveis que devem fornecer sempre resultados negativos, ou para avaliar quantitativamente a eficiência das estações de tratamento de água, a qualidade bacteriológica da água produzida na saída do tratamento e da água distribuída pela rede, assim como acompanhar o decaimento de bactérias indicadoras de contaminação fecal e, portanto, de possíveis bactérias enteropatogênicas ao longo dos processos de tratamento dos esgotos, os níveis de contaminação fecal de mananciais destinados à captação de água para consumo animal e humano após potabilização, para controle da água nas clínicas de hemodiálises, etc.

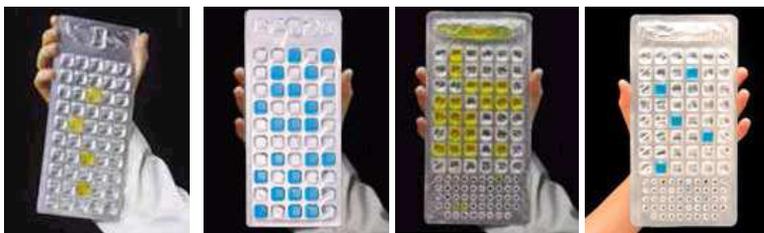
Para realizar o teste quantitativo, usam-se cartelas específicas também da COLILERT® com depressões ou cavidades denominadas células, que são cheias com 100 mL da amostra (ou de suas soluções) onde foi adicionado previamente o meio de cultura. Essas células representam repetições de um mesmo inóculo, ou seja, da mesma diluição da amostra e, portanto, trata-se da aplicação do mesmo método estatístico da Técnica de Tubos Múltiplos, denominada Técnica do Número Mais Provável - NMP. Para a leitura, usa-se tabela de dupla entrada.

O meio de cultura é adicionado diretamente a 100 mL da amostra ou a 100 mL de cada uma de suas diluições, e esse volume é introduzido na cartela, que deve ser selada rapidamente e incubada em estufa bacteriológica a 37°C durante 18 - 24 horas.

As cartelas de COLILERT® fornecidas pelo fabricante são de dois tipos, as que possuem 50 células e as de 90 células, que permitem quantificar, respectivamente, amostras brutas (sem diluição) com até 200 NMP/100 mL de água ou outro líquido e até 2.400 NMP/100 mL.

Após incubação, observa-se primeiro se houve mudança da cor do meio para amarela intensa em alguma célula, o que significa coliformes totais positivos e seguidamente observa-se a mesma cartela sob UV (366 nm), a presença de fluorescência azul confirma *E. coli* (Figura 1 apresenta as cartelas, com células positivas para coliformes totais e *E. coli*).

Figura 1 - Cartelas COLILERT® para quantificar até 200 NMP.100mL⁻¹ (direita) e até 2000 NMP.100mL⁻¹ (esquerda) de coliformes totais (cor amarela e *E. coli*) e *E. coli* (fluorescência)



Fonte: COLILERT® (2002).

As diluições serão preparadas quando a amostra tem alta contaminação microbiana. Diluições seriadas são feitas com água destilada estéril adicionada do meio de cultura em frascos ou erlemeyeres estéreis, com capacidade superior a 100 mL (frascos de 200 mL e erlemeyeres de 250 mL, por exemplo). Preparam-se as diluições seriadas da amostra que se inoculam seguindo as indicações para NMP: em 90 mL de água destilada estéril com meio de cultura se adicionam, com pipeta estéril, 10 mL da amostra de água sob estudo e se

obtem a primeira diluição decimal, 10/100 (10^{-1}), após agitação dessa primeira diluição com outra pipeta estéril, retiram-se 10 mL e se adicionam em outro frasco com 90 mL de água destilada estéril com meio de cultura e se agita; essa é a diluição 10/100 (10^{-2}). Repete-se o procedimento até se preparar a última diluição desejada. Após cada inoculação, deve-se descartar a pipeta em um recipiente com desinfetante. Cada uma dessas diluições será inoculada em uma cartela diferente, a fim de se obterem resultados com células positivas e negativas como visualizados na Figura 1.

Seguem ilustrações com os passos metodológicos da técnica COLILERT® (MUG):

1. Teste de presença/ausência

Figura 2 - Adição do meio de cultura em 100 mL da amostra de água e leitura após 24 h/35°C



Fonte: INTERJET (2013).

2. Técnica Tubos Múltiplos (quantitativo, em cartelas - NMP)

Figura 3 - Adição do meio de cultura em 100 mL da amostra ou de suas diluições

a. Primeiro passo



Adicione o meio de cultura à amostra.

b. Segundo passo



Despeje dentro da cartela Quanti-Tray® (contagem de 1 a 200 NMP) ou Quanti-Tray®/2000 para contagem de 1 a 2400 NMP sem diluições.

Fonte: INTERJET (2013).

c) Terceiro e quarto passos

Figura 4 - Cartela selada na seladora Colilert e leitura para coliformes totais após 24 h a 35°C



Sele a cartela e leve para incubadora 35°C por 24 horas se usou Colilert-24, ou por 18 horas se usou Colilert-18.



Leitura dos Resultados na cartela:
Conte os cubos amarelos = Coliformes Totais
Amarelos/Azul fluorescente = *E. coli*

OU



Leitura na cartela Quanti-Tray 2000:
Cubos amarelos = Coliformes Totais
Amarelo/Azul fluorescente = *E. coli*

Fonte: INTERJET (2013).

Vantagens do Método

Rápido:

- Tempo de manipulação da análise menos de um minuto
- Detecta Coliformes e Contaminação Fecal *E. coli* simultaneamente em 24 horas ou menos
- Não há necessidade de nenhuma confirmação
- Não há manipulação de vidraria ou contagem de colônias

Econômico:

- Reduz em 95% os equipamentos para análises de coliformes
- Com o mesmo preço das análises tradicionais você obtém os resultados de 24 a 48 horas antes
- Redução de tempo em finais de semana
- Prazo de validade 1 ano a partir da data de fabricação. Armazenagem a temperatura ambiente até 30° C

Teste Enzimático de Substratos Cromogênicos - CPRG (vermelho de clorofenil- β -D-galactopiranosídeo) e MUG (β -D-glucoronido-4-metil-umbeliferona) - COLISURE (IDEXX)

IDEXX oferece também um meio de cultura cromogênico diferente para a técnica Colisure® (IDEXX). Esse meio contém o substrato vermelho de clorofenil- β -galactopiranosídeo (CPRG) e também o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG). A hidrólise do CPRG pelos coliformes totais sob a ação da enzima β -galactosidase por eles produzida libera vermelho de clorofenol que muda a coloração do meio de amarelo para vermelho.

A enzima β -glucoronidase do *E. coli* age sobre o 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG) é degradada e libera-se a 4-metilumbeliferona; que é detectada pela fluorescência azul ao expor o tubo ou frasco luz UV (360 nm).

Podem ser feitas quantificações com as cartelas Quany Tray. Procedem-se de forma idêntica ao teste com COLILERT®. Os resultados são apresentados a seguir.

Teste Enzimático de Substratos Cromogênicos 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo X-GAL) - Fluorocult LMX0 (MERCK) ou Readycult Coliformes (MERCK)

O Readycult Coliformes (MERCK) é outra variante de teste enzimático rápido, utilizado para identificação e quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Este meio de cultura contém 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL), que substitui o ONPG do COLILERT como substrato cromogênico, alvo de ação da enzima β -galactosidase, produzida por todos os coliformes totais. A enzima hidrolisa X-GAL libera bromo-cloro índigo que muda a cor do meio de cultura de amarelo suave para azul esverdeado (Figura 7).

O meio contém também 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) sobre o qual age a enzima hidrolítica de *E. coli*, a β -glucuronidase, liberando a 4-metilumbeliferona que é fluorescente, de cor azul, ao ser iluminado com luz ultravioleta de 360 nm.

A confirmação final de *E. coli* se faz com o reativo de Kovac's, para detectar a produção de indol. Para isso, 2,5 mL do reativo são adicionados aos frascos ou tubos. Quando o teste é positivo, ocorre a formação de um anel vermelho na superfície do meio líquido o que indica prova de indol positiva.

Outros Meios de Cultura Com MUG

1 - DIFCO, para a técnica de tubos múltiplos tradicional em tubos de ensaio, oferece caldo "Lauryl Triptona com MUG". Fácil de usar, seguindo-se as indicações do fabricante. Preparam-se os tubos contendo o meio de cultura, que se esterilizam por autoclave e se inoculam igual à técnica tradicional para tubos múltiplos. A leitura é idêntica ao de COLILERT.

2 - OXOID oferece os meios "MUG Supplement", para detecção de *E. coli* em águas, esgotos, alimentos em geral e produtos lácteos. Esta firma oferece o MUG separado para ser adicionado aos meios Ágar MacConkey, Caldo de MacConkey, Verde Brilhante Bilis, Caldo Lauryl Triptose, entre outros. Podem ser usados com a Técnica de Membrana de Filtração e de Tubos Múltiplos.

Amostras de água contendo ácidos húmicos ou outros materiais em suspensão são coloridas e podem dificultar a leitura da fluorescência nos casos de meios líquidos - técnica de tubos múltiplos, sendo necessário incorporar no teste um ou mais tubos controles contendo só a amostra, sem o meio, para fazer o controle falso +. Em outros tipos de água, com alto conteúdo de cálcio, pode haver precipitação deste cátion na forma de sais, embora não afete a reação, pode dificultar

a leitura. Para uma melhor visualização do resultado, evitar inóculos muito carregados.

3 – HIMEDIA, MUG/ EC (variantes Caldo e Ágar)

A composição do meio é: caseína enzimática hidrolisada: 20.00 g/L, mistura de sais biliares: 1.50 g/L, fosfato monopotássico: 1.50 g/L, fosfato dipotássico: 4.00 g/L, 4-Metilumbeliferil β -D-Glucoronida (MUG): 0.05 g/L, lactose: 5.00 g/L e cloreto de sódio: 5.0 g/L, pH final: 6.9 ± 0.2

A caseína enzimática hidrolisada fornece nutrientes essenciais e junto à lactose, que é o carboidrato fermentável pelos coliformes, constituem um meio apto para seu desenvolvimento. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O meio tem um fosfato para o de tamponamento e efetivo controle do pH, evitando a queda do pH na presença dos ácidos produzidos na fermentação da lactose e outras moléculas pelos coliformes. Os sais biliares inibem bactérias Gram-positivas (algumas espécies de *Bacillus* e estreptococos fecais).

A atividade de β -glucuronidase pode ocorrer em 4 horas, mas algumas linhagens têm atividade lenta dessa enzima e requerem 18 a 24 horas de incubação. O ajuste do pH com hidróxido de sódio aumenta a fluorescência e de igual modo expondo as culturas a vapores de amônia. Crescimento abundante de *Proteus vulgaris*, presentes em especial em amostras ambientais, podem inibir a produção de gás pelos coliformes em geral, incluído *E. coli*, mas essa característica metabólica dos coliformes não é necessária para definir a positividade da amostra quando se usam meios de cultura com MUG. A detecção de *E. coli* em culturas puras ou mistas se baseia na ação das enzimas de *E. coli* sobre os substratos orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) e

β -D-glucoronido-4-metil-umbeliferona (MUG), dentro das 4 a 24 horas após a inoculação.

Para usar o caldo HIMEDIA, MUG-EC Caldo para a Técnica de Tubos Múltiplos, deve-se fazer o teste presuntivo com caldo PA (M1186) ou com o caldo Lauril Sulfato (M080): preparam-se as séries de tubos, como visto na técnica de TUBOS MÚLTIPLOS – NMP, com um dos dois meios de cultura citados e se inoculam as três diluições seriadas da amostra com cinco repetições para cada uma (10, 1, 0,1 mL repetidos em 5 tubos) e incubam-se a 35°C - 37°C por 18-24 horas. Todos os tubos presuntivos com crescimento (turbidez), formação de gás ou acidificação devem ser repicados para tubos com caldo MUG-EC (M1042) para o teste de confirmação de *E. coli*. Após a incubação a 35°C - 37°C por 4 - 24 horas, a presença de fluorescência azul brilhante é a resposta positiva para *E. coli*. Proceda-se à leitura dos tubos positivos. Para saber a concentração final por 100 mL, são consultadas as tabelas de NMP.

No Capítulo de Técnica de Tubos Múltiplos (capítulo 9), estão detalhadas as etapas metodológicas correspondentes.

4- Aquateste Coli – INTERLAB

O Aquateste Coli é um meio em pó, composto por nutrientes, ONPG (ortonitrofenol- β -galacto-piranosídeo) e MUG (methyl-umbelipheril-glucuronide), apresentado em frascos para 100 mL de amostra.

Para proceder à detecção de coliformes e *E. coli*, abre-se o recipiente com meio de cultura e seu conteúdo é vertido em um frasco estéril com 100 mL de amostra em análise. Agita-se suavemente até a homogeneização do meio com a amostra. A seguir, deve-se incubar em estufa a 35°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) durante 18-24h. As amostras coliformes positivas são detectadas

visualmente por desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura, e a presença de *E. coli* é detectada pela fluorescência azul quando se expõe o frasco ou tubos à luz ultravioleta. A amostra deve ter pouca turbidez, ou seja, alta transparência para permitir visualizar os câmbios de cor e a luminescência azul. Por isso, amostras escuras deverão ser diluídas antes de uso.

Referências

APHA, AWWA, WPCF. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater*. E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, L. S. Clesceri (Eds.). 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1998.

COLILERT®. **Um teste simples de 24 horas para coliformes e *E. coli***. 2002. Disponível em: <https://www.idexx.com/pdf/en_us/water/64063001.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.

COLISURE – IDEXX. Disponível em: <<https://ca.idexx.com/water/products/colisure.html>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

GREGHI, S. Q. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos**. 98f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Araraquara/SP. 2005.

INTERJET Artigos para laboratórios. **Colilert**: reagente para coliformes E. Colisubstrato cromogênico definido ONPG-MUG. Disponível em: <<http://www.interjet.com.br/produto/129499/colilert-reagente-coliformes-ecoli-subst-cromogenico.aspx>>. 2013. Acesso em: 08 nov. 2015.

MERCK/MILLIPORE. Disponível em: <www.merckmillipore.com/BR/pt>. Acesso em: 15 ago. 2015.

CAPÍTULO 12

Detecção e quantificação de protozoários em águas superficiais e potáveis

A transmissão de protozoários patogênicos via água de consumo é conhecida há muito tempo, mas, desde o século XIX e até os anos 1980, as doenças de origem bacteriana como disenterias, cólera, febre tifoide e paratifoide foram as principais associadas à água. A melhoria nos processos de tratamento de potabilização da água, especialmente a desinfecção com cloro, foi efetiva em reduzir as bactérias patogênicas do trato entérico (SMITH et al., 2006) e a confiança nos processos de potabilização dominou o panorama sanitário mundial por longo tempo.

Nos últimos 25 a 30 anos, as doenças causadas por protozoários tornaram-se um dos principais problemas de Saúde Pública, ao se reconhecer que cistos e oocistos de protozoários não eram removidos com a mesma eficiência que as bactérias nos processos do tratamento convencionais da água incluída a cloração.

Os parasitas intestinais ocorrem pela ingestão de água e outros alimentos contaminados com cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos patogênicos que afetam principalmente o trato digestório. Apresentam ampla distribuição geográfica e constituem sérios problemas de saúde pública pela elevada prevalência e pelos efeitos no estado nutricional e imunológico das populações. Estima-se que aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão

infectadas por algum parasita intestinal. Destas, cerca de 450 milhões manifestam a doença e são na maioria crianças que habitam países em desenvolvimento.

Muitas dessas parasitoses são causa de deficiências no desenvolvimento físico e cognitivo das crianças. Sua transmissão é fecal-oral e a facilidade de veiculação das formas infecciosas (cistos, oocistos e ovos) depende das condições ambientais de saneamento básico e da higiene nas comunidades, fatores que as tornam mais ou menos vulneráveis.

A maior vulnerabilidade da população infantil, em torno de 68%, deve-se, em parte, às carências nutricionais que afetam a maturidade do sistema imunológico, aos comportamentos típicos da idade em relação aos preceitos básicos de higiene, ao contato constante com solos contaminados e às carências de saneamento básico, em especial, à coleta e ao destino final dos esgotos e à falta de água de boa qualidade em quantidade apropriada (SATURNINO, 2005; WHO, 2006; CLASEN et al., 2009). Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, milhares de famílias vivem em moradias carentes de água tratada e destino adequado das fezes e dos esgotos, permitindo a circulação e a permanência dos parasitas relacionados com a água (CIMERMAN; CIMERMAN, 2010). Em consequência das deficiências higiênicas no armazenamento e na manipulação dos alimentos, facilita-se a infecção com materiais contaminados com material fecal, que transmitem o patógeno para uma ou mais pessoas, e estas para as outras (CUTOLO; ROCHA, 2000).

Dentre os protozoários parasitas mais frequentes, destacam-se *Entamoeba histolytica*, *Giardia* sp, *Cryptosporidium* sp. Citam-se também *Cyclospora cayetanensis* e *Toxoplasma gondii* que, embora menos frequentes, existem registros no Brasil. Entre os helmintos, são predominantes *Ascaris lumbricoides* e ancilostomídeos. Esses dados seguem as tendências mundiais que citam como mais frequentes dentre os

nematelmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos; dentre os protozoários, a *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* e, ultimamente, *Cryptosporidium* spp (BRASIL, 2010).

Dados do Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), destacam a prevalência geral média de parasitose em torno de 36% da população, com extremos de 15 a 80%, dependendo da região. Os maiores valores estiveram concentrados no Norte e no Nordeste do país. Nos lactentes, foram de 15%, nos escolares, de 23,3% até 66,3%, com registros de um total de 15 a 37% de casos de poliparasitismo. As parasitoses mais frequentes em ordem decrescente foram: ascaridíase 16 a 41% > giardíase 6 a 44% > amebíase 4 a 23% > ancilostomíase 2 a 17%.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004) estimou que 200 e 500 milhões de indivíduos albergassem *G. lamblia* e *E. histolytica* respectivamente. Cerca de 1 milhão de indivíduos estão infectados por *A. lumbricoides* e um contingente menor por *T. trichiura* e ancilostomídeos.

A prevalência de *Giardia lamblia* (ou *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*), nos países industrializados, era, na época, de 2% a 7%, e, nos países em desenvolvimento, mais de 10 vezes superior: de 20% a 60% (THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990). Embora *Cryptosporidium* não seja citado, este teve maiores registros nos países desenvolvidos até 1993 e posteriormente ao surto em Milwaukee/Michigan/Estados Unidos, ocorrido nesse ano, a adoção de normas mais rígidas de controle da qualidade da água de beber e da qualidade ambiental levou a uma redução significativa. No Brasil, existem trabalhos sobre sua presença no ambiente e surtos antes de 1989, mas maiores registros aparecem após 1993, sob estímulo das pesquisas ao redor do mundo, também nesses anos.

A Tabela 1 mostra os protozoários patogênicos mais comuns e algumas de suas características epidemiológicas.

Tabela 1 - Principais protozoários patogênicos e algumas características epidemiológicas

<i>Patógeno</i>	Dose infetante ¹	Carga Excretada	Reservatório Animal	Ciclo Biológico monoxênico ²	Estágio no meio ambiente ⁵
<i>Entamoeba histolytica</i>	Baixa	Alta	Não	Sim	Não
<i>Giardia duodenalis</i>	Baixa	Alta	Sim ⁴	Sim	Não
<i>Cryptosporidium</i> spp	Baixa	Alta	Sim	Sim	Não
<i>Toxoplasma gondii</i>	Baixa	Alta	Sim	Não ⁵	Sim ⁶
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Baixa	?	Não	Sim	Sim ⁷
<i>Microsporidia</i>	Baixa	?	Sim ⁸	Sim	Não
<i>Isoospora belli</i>	?	?	Não	Sim	Sim ¹⁰
<i>Balantidium coli</i>	?	?	Sim ⁹	Sim	Não
<i>Acanthamoeba</i>	Baixa	? ¹¹	Não	Sim	Não
<i>Naegleria fowleri</i>	Baixa	? ¹¹	Não	Sim	Sim

(1) Dados de estudos experimentais com voluntários humanos ou animais ou evidências epidemiológicas. (2) Necessita de um único hospedeiro para completar o ciclo biológico. (3) Necessita de um período de maturação no ambiente para ser infetante. (4) Várias espécies animais são reservatórios. (5) Felídeos são os hospedeiros definitivos (ocorre o ciclo sexuado do parasita, com produção de oocistos e eliminação nas fezes); o ser humano e espécies de mamíferos e aves são os hospedeiros intermediários (ocorre o ciclo assexuado com formação de cistos teciduais). (6) Tempo médio para esporulação dos oocistos: 1 a 5 dias. (7) Tempo médio para esporulação dos oocistos: 15 dias (7 a 12 dias). (8) Suínos podem ser hospedeiros de microsporídios que infectam o homem. (9) Homem é principal hospedeiro; os suínos são reservatórios, contribuem para a ocorrência e manutenção de cistos no ambiente. (10) Tempo médio para a esporulação: 1 a 2 dias. (11) A forma vegetativa, trofozoítica, pode se multiplicar na água.

Fonte: Bevilaqua, Azevedo e Cerqueira (2009).

Verifica-se que para os quatro primeiros parasitos, as doses infetantes são baixas e as descargas nas fezes dos indivíduos infetados são altas. Como citado no Capítulo 1, DI médias baixas se referem a menos de 100 partículas (bactérias, vírus,

cistos, oocistos e ovos) necessárias para causar a infecção. DI médias se referem a 1000 até 10.000 partículas, e altas entre 100.000 até 1.000.000 ($10^5 - 10^6$). Ou seja, bastam poucas unidades de cistos ou oocistos para causar a infecção, enquanto os altos números lançados ao ambiente permitem sua rápida e intensa circulação, com a observação de que cistos e oocistos são bastante resistentes às condições ambientais adversas para outros microrganismos. Por exemplo, a dose infectante média de *Cryptosporidium sp* é de 30 oocistos para uma pessoa sadia, e uma pessoa infetada descarrega em cada grama de fezes em torno de 10^5 a 10^6 dessas partículas.

Cryptosporidium spp* e *Giardia spp

Os protozoários patogênicos apresentam uma forma infetante (os cistos ou oocistos) e uma forma parasitária (a forma vegetativa ou trofozoito) que vivem, crescem e se reproduzem no hospedeiro; somente poucos gêneros podem viver algum tempo na água. Alguns apresentam ciclos biológicos complexos, com mecanismos variados de transmissão e passam por diferentes morfologias ao longo de seu processo evolutivo e reemergem, respectivamente, como importantes contaminantes biológicos associados à veiculação hídrica. Foram reportados globalmente em curto tempo, no mínimo, 325 surtos epidêmicos relacionados a esses protozoários parasitas (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007).

As infecções por *Giardia* e *Cryptosporidium* são prevalentes em alguns países do hemisfério sul e foram consideradas as mais importantes protozooses intestinais, inclusive em países desenvolvidos. O reservatório animal da cryptosporidiose são todos os animais domésticos, embora os selvagens não estejam excluídos.

Na literatura, é citada como alta a resistência dos cistos de *Giardia* no ambiente (água e solo) e como muito alta para os oocistos de *Cryptosporidium*, embora não está definido o tempo de sobrevivência por depender dos fatores ambientais, como temperatura e umidade, entre outros (WHO, 2006).

Infecções por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* provocam diarreia persistente com graves consequências sobre o estado nutricional e desenvolvimento físico e mental, principalmente em crianças, e podem ser a causa de óbito de indivíduos imunodeprimidos e anciãos pela rápida e intensa desidratação e perda de peso (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007).

A prevenção inclui, principalmente, cuidados com a qualidade da água de beber, e, como os cistos e oocistos são resistentes aos desinfetantes comuns, a desinfecção pode ser por fervura ou radiação ultravioleta (UV), ozônio, ou cloro com alto tempo de contato e através da cuidadosa higiene pessoal e dos alimentos.

Cryptosporidium

Seu nome significa “germe escondido” (*Crypto*: escondido, guardado, secreto; *Sporidium*: esporo, semente). É um importante protozoário patogênico em movimento e de vida intracelular obrigatória, transmitido por veiculação hídrica.

Pertence à classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, família Cryptosporididae. Foi descrito pela primeira vez por Tyzzer em 1907, e considerado não patogênico. Os dois primeiros casos reconhecidos de criptosporidiose humana foram relatados somente em 1976, nos Estados Unidos, em uma criança de três anos de idade residente em uma zona rural (NIME et al., 1976) e o outro em um adulto imunodeprimido (MEISEL et al., 1976).

Provoca gastroenterites em crianças e diarreias auto-limitadas em indivíduos sadios e infecções crônicas em imunodeficientes. A infecção dura de poucos dias a duas semanas em imunocompetentes. São pouco frequentes os casos de portadores assintomáticos de *Cryptosporidium*. A doença não possui esquema terapêutico definido (UNGAR, 1995).

O diagnóstico requer da observação de oocistos nas fezes, com uso da coloração “álcool-ácido-resistente” ou Técnica de Ziehl-Neelsen que se usa para as micobactérias (lepra e tuberculose), e requer a confirmação pela visualização do oocisto por imunofluorescência. Simultaneamente pode ser feita a sorologia por métodos imunoenzimáticos (ELISA).

O ciclo de vida deste protozoário é complexo com uma fase assexuada e outra de multiplicação sexuada (CAREY; LEE; TREVORS, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2007). O oocisto é a estrutura reprodutiva, infecciosa e de resistência do *Cryptosporidium*. Facilita a infecção por via fecal-oral. O ciclo assexuado tem início quando o oocisto é formado e eliminado no ambiente onde ocorre sua esporulação, com produção de esporozoítos que ficam dentro do oocisto. Este é ingerido, e o oocisto esporulado se rompe no intestino por efeito dos ácidos estomacais e dos sais biliares, liberando os esporozoítos que invadem os enterócitos. Em seguida, reproduz-se de forma assexuada e forma o esquizonte multinucleado, passa pela esquizogonia, fase que produz os merozoítos, permitindo a invasão de novas células hospedeiras. A partir desses merozoítos, pode-se recomeçar outro ciclo assexuado ou iniciar a reprodução sexuada (esporogonia). No ciclo sexuada, os merozoítos se diferenciam em gametócitos dentro do enterócito. Alguns dos merozoítos, os denominados microgametócitos, produzem os gametas masculinos, e os macrogametócitos se transformarão nos

gametas femininos. O microgametócito é liberado do enterócito e invade a célula onde está o macrogametócito formando o zigoto. Este encista rapidamente originando o oocisto. O tempo da esporulação depende das condições ambientais. A esporulação se completa quando cada esporoblasto forma esporozoítos, que caracterizam o oocisto infectante. Na esporulação, o *Cryptosporidium* produz quatro esporozoítos no interior do oocisto (NEVES, 2005).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil, entre 1988 e abril de 1999, mostraram a ocorrência de 4.691 casos de criptosporidiose entre 155.590 portadores de HIV.

A veiculação hídrica do *Cryptosporidium* é facilitada pelo longo período que o oocisto permanece viável no ambiente, pelo seu tamanho reduzido (2-5 µm) e pelas altas cargas excretadas pelos doentes. Podem ser transmitidos a numerosas pessoas ao beber água da rede de distribuição e ingerir alimentos contaminados, através do contato de um indivíduo doente para outro ou de um animal para o homem (ROSE, 1990).

A epidemia de criptosporidiose em Milwaukee (USA), no ano de 1993, foi causada pela contaminação da água do lago Michigan com esgotos despejados à montante de uma Estação de Tratamento de Água que abastecia a cidade. Provocou 403.000 casos de diarreia e mais de 100 mortos numa população de um milhão de habitantes (MACKENZIE et al., 1994). Essa calamidade alertou a todo o mundo sobre a maior resistência dos cistos e dos oocistos às condições da desinfecção com cloro no sistema convencional de tratamento de água, denominado também “de ciclo completo”, e estimulou pesquisas sobre os efeitos diferenciais de cada etapa da potabilização sobre o comportamento de bactérias, vírus, cistos, oocistos e ovos de parasitos. Observou-se que enquanto as bactérias e vírus respondem bem aos processos químicos como a cloração, os protozoários e helmintos são

removidos principalmente por processos físicos, nesse caso, a sedimentação e a filtração.

Em consequência, foi evidenciado que os “indicadores universais”, os coliformes, não têm o mesmo comportamento ao longo dos sistemas de tratamentos (de águas, esgotos e lodos) que os patógenos não bacterianos e, em consequência, os coliformes são indicadores limitados de contaminação fecal por protozoários e helmintos patogênicos.

A presença de coliformes, em especial de *E. coli*, é um alerta de contaminação fecal, mas sua ausência não indica ausência de todos os patógenos presentes nas fezes; e, portanto, seu uso deve ficar restrito à indicação de enterobactérias patogênicas. Ficou evidente a necessidade em dominar tecnologias de detecção, isolamento, identificação e quantificação de protozoários e helmintos, que devem ser simples, econômicas e rápidas.

Até agora, as técnicas disponíveis são complexas, demoradas e caras. Simultaneamente, adotaram-se parâmetros auxiliares não biológicos de referência que permitissem obter informações mais seguras de ausência de ovos, cistos e oocistos nas águas tratadas. Foram escolhidos a turbidez, como indicador de remoção de partículas, a qual deve ser inferior a 1uT na água tratada e o binômio “residual do desinfetante x tempo de contato”. Em consequência, passou-se a produzir águas tratadas com valores muito mais baixos de turbidez que os permitidos até então. Esses novos conhecimentos motivaram mudanças da legislação para água potável em todo o mundo.

Alguns dados do *Cryptosporidium* e da cryptosporidiose

- 7×10^6 oocistos/g de fezes é a densidade de oocistos excretados na luz intestinal com as fezes de uma pessoa infectada.

- 10 bilhões são o número de oocistos excretados no curso de uma infecção.
- $DI_{50} = 30$ oocistos é a dose infetante mínima de oocistos a ser ingerida para causar a infecção (DUPONT et al., 1995).
- $DI_{50} = 132$ oocistos é a dose infetante média de oocistos a ser ingerida para causar a infecção.
- Taxa de decantação em águas: 0,00 a 0,037 log por dia.
- Apresenta carga negativa em pH alcalino e próximo do neutro e sem carga a pH levemente ácido.
- Pode reinfetar o mesmo hospedeiro (autoinfecção) facilitada pelo alto número de oocistos excretados e a baixa DI.
- Sai ao exterior com as fezes, permanece viável por longo tempo (depende das condições ambientais) e infecta novos hospedeiros.

No ambiente, a circulação de *Cryptosporidium* spp é detectada pelo isolamento dos oocistos. Valores de oocistos em esgotos efluentes de tratamentos variaram entre 850 a 13.700 oocistos/L e em efluentes tratados de 140 a 3.960 oocistos/L na Arizona (MADORE et al., 1987); já De Leon et al. (1988) encontraram em esgotos brutos de 39,7 até 521 oocistos/L, na Inglaterra, efluentes de lodos ativados e de lagoas de estabilização apresentaram entre 3,3 a $8,51 \times 10^3$ oocistos/L e, na zona oeste de África, até 2×10^4 oocistos /L (SMITH; ROSE, 1998).

Alguns pesquisadores consideram que as informações sobre surtos de veiculação hídrica de *Cryptosporidium* não representam a gravidade real para a saúde pública por falhas nos registros: surtos e casos isolados não são relatados pela falta de seu reconhecimento, sendo citados como diarreias inespecíficas (CRAUN, 1990).

No Brasil, os estudos mais citados de *Cryptosporidium* no ambiente são os de Newman et al. (1994) em Fortaleza, que detectaram oocistos em águas de 22,2% dos poços amostrados e usados para consumo humano; os de Gamba et al. (1997), em Itaquaquetuba (SP) em 100%, e os de Muller (2000) que evidenciou oocistos de *Cryptosporidium* spp em dois mananciais que abasteciam duas estações de tratamento de águas (ETA) da região metropolitana de São Paulo; em uma, foi encontrado *Cryptosporidium* em 22,91% das amostras de águas tratadas.

Nas últimas décadas, foi observado um declínio de até 30% na prevalência de enteroparasitos em escolares do Brasil (FERREIRA; FERREIRA; MONTEIRO, 2000; BASSO et al., 2008), mas estudos em cidades do Nordeste brasileiro revelaram ainda elevada prevalência de parasitoses: 84,9% em Natal-RN (SATURNINO, 2005) e 96% em Pacatuba-SE (FERREIRA et al., 2006).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB) encontrou *Cryptosporidium* sp e *Giardia lamblia* em vários rios utilizados para a captação de água para abastecimento humano e recreação (HACHICH et al., 2004). Os fatores mais relevantes da contaminação dos corpos aquáticos foram os despejos de esgotos e as chuvas intensas que escoam águas contaminadas da lavagem de bacias hidrográficas com uso e ocupação desordenadas (QUADROS et al., 2004; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

O Ministério da Saúde incluiu na Portaria nº 2914/2011 para água potável o monitoramento obrigatório da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e de cistos de *Giardia*, quando a média geométrica anual de *E. coli* na água bruta superficial for maior ou igual a 1.000 *E. coli*/100 mL (BRASIL, 2011). Este tópico representa um avanço em relação à portaria anterior, Nº 518/2004-MS, que apenas recomendava a sua pesquisa (BRASIL, 2004).

Giardia lamblia

Giardia lamblia ou *Giardia intestinalis* ou *Giardia duodenalis* é um parasito de transmissão hídrica, de vida intracelular com ciclo completo em um único hospedeiro (monoxênico). Foi descrito, em 1665, por Antony van Leeuwenhoek, usando um microscópio (lupa com aumento 400 x) desenvolvido por ele e que lhe permitiu observar seus flagelos.

Está classificada no Phylum *Sarcomastigophora*, Subphylum *Mastigophora*, Família *Hexamitidae*, Gênero *Giardia* (com mais de quatro espécies).

Muitos infectados com *G. lamblia* são assintomáticos. A intensidade da infecção e as consequências dependem da linhagem da cepa do parasita e do estado imunológico do hospedeiro, entre outros fatores. Circulam desde alguns anos atrás cepas resistentes aos esquemas terapêuticos tradicionais que preocupam as autoridades mundiais de saúde pública (NASH et al., 2001).

Infeta a porção superior do intestino delgado e causa com muita frequência diarreias em grande variedade de espécies animais, incluindo o homem (GEURDEN; VERCRUYSSSE; CLAEREBOU, 2010). A transmissão ocorre pela ingestão de cistos infectantes através da água ou de alimentos contaminados, ou por via fecal-oral direta (COTTON; BEATTY; BURET, 2011). Os principais sinais clínicos incluem náusea, perda de peso, edema, dor abdominal e diarreia. A infecção por *G. intestinalis* é multifatorial, envolvendo fatores do parasito e do hospedeiro. Estudos sugerem o envolvimento do parasito em doenças intestinais crônicas, como síndrome do cólon irritável, e em doenças extraintestinais, embora o agente permaneça restrito ao trato intestinal. Há evidências de seu envolvimento no atraso do crescimento em crianças (ROBERTSON et al., 2010).

No Brasil, a prevalência varia de 12,4% a 50%, dependendo da região e da faixa etária, predomina em crianças entre zero e seis anos. Pode ser transmitida por ingestão de cistos que contaminam água e alimentos (vias mais frequentes), por contato interpessoal (enfermos institucionalizados em creches e hospitais psiquiátricos) e via sexual (sexo anal/oral - teoricamente possível), mas não plenamente aceita (SANTANA et al., 2014). Embora seja uma infecção com bom prognóstico, pode ser grave em pessoas com desnutrição, fibrose cística ou com algumas imunodeficiências.

Alguns dados de *Giardia* e giardíase

- 7 milhões/grama são o número de cistos excretado nas fezes.
- 10 bilhões são o número de oocistos excretados no curso de uma infecção.
- $DI_{50} = 10$ cistos é a dose infetante mínima a ser ingerida para causar a infecção.
- $DI_{50} = 50$ cistos é a dose infetante média a ser ingerida para causar a infecção.
- Taxa de sedimentação = 14 cm por dia.
- Liberados ao exterior com as fezes, viáveis por longo tempo (depende das condições ambientais) e infectam novos hospedeiros.
- Podem reinfetar o mesmo hospedeiro (autoinfecção).
- Grupos susceptíveis: crianças > 5 anos, idosos, imunodeprimidos.
- Todos podem ser infectados sem diferença de sexo, raça, idade, etc.

Patógeno de Referência

O reconhecimento das limitações do grupo das bactérias coliformes e de *E. coli* para avaliar presença/ausência de microrganismos, em especial de protozoários em água, fez necessário considerar novos indicadores não bacterianos que indicassem um grupo mais amplo de microrganismos.

A OMS introduz o termo **Patógeno de Referência** ou organismo de referência para aquele que reúne um conjunto de características que permite representar a todo um grupo de microrganismos cuja presença não pode ser indicada pelas bactérias coliformes, e se aplica principalmente aos protozoários e aos helmintos (WHO, 2006). A escolha do patógeno ou organismo de referência recai naquele que possui maior resistência e dificuldades para sua remoção e ou inativação e que representa importantes impactos à saúde. Se o sistema de abastecimento cumpre os requisitos de produzir água com qualidade adequada considerando o patógeno de referência, significa que também atinge aqueles padrões necessários para o grupo de patógenos como um todo.

Foram escolhidos os oocistos de *Cryptosporidium* e os cistos de *Giardia* que por sua persistência no ambiente, elevada resistência aos tratamentos usuais de água e à desinfecção por cloro, por serem comuns na população, provocarem em geral sintomas moderados, e porque foram associados com casos esporádicos, surtos e epidemias após consumo de água potável. Torna-se, então, preeminente dispor de uma técnica eficiente que permita sua detecção.

Métodos de detecção dos protozoários *Cryptosporidium spp* e *Giardia spp* em águas

A análise de protozoários em água traz uma série de desafios científicos e tecnológicos, uma vez que as metodologias

reconhecidas internacionalmente são de alta especificidade. A inserção desse tipo de metodologia na rotina de laboratórios certificadores da potabilidade da água ainda é incipiente no Brasil. Mas a legislação pertinente (Portaria 2914/2011 – MS, BRASIL, 2011) exige que sejam quantificados oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em associação com *E. coli* ou coliformes termotolerantes quando a média geométrica anual destes últimos nos pontos de captação seja superior a 1.000 *E.coli*.100mL⁻¹. Ainda, quando a média aritmética da concentração de oocistos de *Cryptosporidium spp* for maior ou igual a 3,0.L⁻¹ nos pontos de captação da água, a turbidez do efluente filtrado por filtração rápida deverá ser menor ou igual a 9,3 uT ou alternativamente se deve empregar desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos.

Não existe um procedimento universalmente aceito para avaliação de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Em 1997, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) desenvolveu o método 1622 para análise de protozoários em águas que foi aprimorado em 2005 e denominado método 1623. Este consta de várias etapas: filtração, eluição, concentração, purificação, separação imunomagnética, detecção, quantificação, coloração – DAPI e imunofluorescência. A separação imunomagnética (IMS) consiste na separação dos oocistos da matéria orgânica da água com uso de uma barra magnética a qual fornece melhor e maior purificação da amostra. O método mostrou acurácia na concentração, identificação e quantificação dos oocistos e cistos de protozoários (McCUIN; CLANCY, 2002).

Mesmo com restrições, o método 1623 (USEPA, 2005) é uma técnica adequada para detecção de protozoários em amostras de água. Para sua implementação é necessária uma boa experiência dos analistas e consideráveis investimentos econômicos (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

Determinação de *Cryptosporidium* e *Giardia* pelo Método 1623 da USEPA (2005): técnica de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência

O Método 1623 foi desenvolvido para a determinação desses protozoários em amostras de água bruta ou tratada (USEPA, 2005). É uma das técnicas mais avançadas atualmente disponível, embora seja de baixa recuperação ($33,6 \pm 20,2\%$) e não permita a identificação das espécies desses protozoários.

Fundamentos do método

O método 1623 (USEPA, 2005) tem as seguintes etapas: a) concentração da amostra por filtração e centrifugação; b) purificação por separação imunomagnética (IMS); c) coloração e leitura de lâminas (microscopia de imunofluorescência - FA).

Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* são diferenciados pelo corante DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole), seguido de microscopia de Contraste por Interferência Diferencial. Identifica gêneros e não espécies.

A seguir, são apresentados, de forma resumida, o material e métodos para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp, pelo método 1623.

Tabela 2 - Resumo do material e métodos de análise das amostras de água para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp pelo método 1623 (USEPA, 2005)

(continua)

Etapa	Material	Reagentes
Coleta	Galões plásticos de 10L a 50L (descartáveis)*; autoclave; recipientes plásticos de 8L	Solução de Tampão Fosfato com Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4; Extradiluído
Filtração	Módulos de filtro/espuma porosidade 1 µm (Sistema Filt-Max – IDEXX/EUA); bomba peristáltica (Modelo: R60 DZ71D4/Fabricante: Sew/Brasil)	Solução de Tampão Fosfato com Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4
Eluição	Stomacher (Modelo: MK1204/Boitton/Brasil), sacos plásticos p/stomecher Béquer; tubos de centrifuga 250 e 50 mL; balança digital; centrifuga (Modelo: CT 6000D/Cientec/Brasil)	Solução Tampão Fosfato com Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4
Concentração	aceleração de 1500g c (2700 rpm) – por 15 minutos; vórtex (Modelo: MSI Minishaker / Fabricante IKA)	Solução de Tampão Fosfato com Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4
Purificação - Separação Imunomagnética – Sistema Dynal/Biobeads	Tubo lado chato (Leighton); kit Dynal (Oslo/Noruega); agitador rotativo (homogeneizador sanguíneo – Modelo: AP22/ Phoenix) 18 rpm 1 hora; concentrador magnético MPC-1 – Magnetic Particle Concentrator; tubo Eppendorf; banho seco/Quimis)	Solução Tampão Fosfato com Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4; água destilada; reagentes de separação imuno magnética (Crypto-Combo e Giardia-Combo); solução tampão-A 10x concentrada e tampão-B 10x concentrada (Kit Dynal)

Detecção e quantificação - Imunoflu- orescência e coloração com DAPI	(Kit Merifluor/EUA) – Coloração DAPI/Sigma (4',6-diamidino-2- fenil indol) – Contraste de Interferência Diferencial (CID) – (modelo do microscópio: DMLB/: Leica- Alemanha); *câmara úmida; pipeta Pasteur; lamínula Perfecta 24 x 60 mm	Solução de Tampão Fosfato sem Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4 e Solução de Tampão Fosfato c/ Tween 20 – 1% concentrada, pH 7,4; meio de montagem (glicerol); corante DAPI/Sigma (4', 6- diamidino-2-fenilindol)
---	--	---

Fonte: Lopes (2009) modificada.

Especificações dos materiais e reagentes necessários são citadas a seguir.

Materiais:

1. Para a coleta da amostra: galões ou recipientes plásticos (polietileno) para coleta com 10 a 50 litros. Devem ser preferencialmente descartáveis.
2. Agitador de tubos (tipo Vortex).
3. Agitador magnético.
4. Agitador rotatório (18 rpm/min).
5. Barras magnéticas.
6. Béqueres de 1000 ou 2000 mL.
7. Bomba de vácuo/pressão (capacidade mínima de 5 bar).
8. Centrífuga capaz de 1500g equipada com rotores para tubos cônicos de 50 e 250 mL.
9. Concentrador de partículas magnéticas para tubos de 10 mL (MPC®1 ou MPC®6).
10. Concentrador de partículas magnéticas para tubos de microcentrífuga (MPC®-M ou MPC®-S).
11. Estação de lavagem e concentração (Filta-Max).
12. Filtros de espuma (Filta-Max).

13. Homogeneizador (Stomacher) com capacidade de 300-350 golpes/minuto.
14. Lâminas para microscopia de fluorescência.
15. Lamínulas (mínimo 24x32 mm).
16. Membrana de policarbonato de 25 mm de diâmetro e retenção de 1 μ m.
17. Micropipetadores com volume variável de 100-1000 μ L e 10-100 ou 20-200 μ L.
18. Microscópio óptico equipado com contraste interferencial diferencial (DIC) e epifluorescência, Pipetas Pasteur.
19. Pipetas sorológicas de 5 e 10 mL.
20. Ponteiras de polipropileno com capacidade para 200 - 300 μ L e 1000 μ L.
21. Proveta de 500 mL.
22. Porta-filtro de espuma.
23. Sacos plásticos compatíveis com o stomacher.
24. Tubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo eppendorf).
25. Tubos cônicos de centrifuga com capacidade de 250 mL e 50 mL.
26. Tubos de Leighton (lado plano).

Reagentes:

1. Acetona.
2. Ácido clorídrico.
3. Glicerol.
4. Hidróxido de sódio.
5. Etanol.
6. Metanol.
7. Água reagente (água ultrapura).
8. Tween® 20 (Sigma Chemical):

- 8.1. Tampão fosfato salino - PBS pH 7,4 (Sigma Chemical), 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15g Na₂HPO₄ anidro; 0,2 g, KH₂PO₄; 1,0 L água reagente.
- 8.2 DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Chemical).
9. Soluções para eluição dos filtros:
 - 9.1 Tampão fosfato salino/ Tween® 20 (PBST): Adicionar 0,10 mL (100 µL) de Tween® 20 a 1,0 L a solução Tampão Fosfato salino (PBS).
 - 9.2 Solução estoque: dissolver 2 mg DAPI em 1,0 mL de metanol absoluto.

Nota: Preparar volumes mínimos para o uso e colocar em frasco ou tubo estéril protegido da luz com tampa rosqueada. Armazenar entre 1°C e 10°C. Não permitir congelamento. Descartar a solução após duas semanas ou quando o controle positivo der negativo.

- 9.3 DAPI (solução de uso - seguir instruções do fabricante do kit de anticorpos): adicionar 0,01 mL de DAPI (solução-estoque) a 50 mL de PBS.

Nota: Preparar volumes mínimos para o uso e colocar em frasco ou tubo estéril protegido da luz com tampa rosqueada. Armazenar entre 1°C e 10°C. Preparar a solução diariamente.

10. Soluções para montagem das lâminas:

- 10.1 Glicerol/PBS: Misturar 60 mL de Glicerol e 40 mL de PBS.

Nota: Preparar no momento do uso.

- 10.2 Meio de montagem DABCO/Glicerol: pesar 2,0g de DABCO (Sigma Chemical) e colocar em um balão volumétrico. Acrescentar 95 mL de solução de glicerol/PBS morna (aquecida) e misturar até a completa dissolução do reagente. Completar o volume para 100 mL e colocar em frasco estéril

com tampa rosqueada com capacidade de 100 mL.
Manter refrigerado de 2 a 8°C (validade: 3 meses).

Metodologia adotada pela FUNASA (BRASIL, 2013)

A- Coleta da amostra

1. Coletar 10 L ou de 50 L enchendo completamente o recipiente. O método com filtro de espuma Filta-Max® foi validado para 50 L, mas podem ser usados volumes menores de amostra.
2. Todo o volume deve ser coletado em um único recipiente e preservado entre 1°C e 10°C, cuidando para não congelar.

B - Identificação da amostra

1. Identificar adequadamente a amostra.
 - Registrar procedência, data e hora da coleta.
 - Registrar data do início da análise, volume analisado e volume do centrifugado.
 - Registrar informações dos lotes dos reagentes e soluções utilizados.

C - Filtração

1. Colocar o filtro de espuma no porta-filtro.
2. Conectar o porta-filtro ao recipiente com a amostra e à bomba ou linha de pressão com a mangueira de silicone.
3. Armazenar efluente da filtração em recipiente graduado e medir seu volume.

4. Concluída a filtração, desligar a pressão. Desconectar o porta-filtro e tampar com rolha de borracha seus pontos de entrada e saída.
5. Proceder à eluição. Se esta não pode ser feita imediatamente, deve-se armazenar o porta-filtro/espuma sob refrigeração de 1 a 10°C e pode deixar um máximo de 96 h.

D - Eluição

O processo de eluição pode utilizar a estação de lavagem Filta-Max® ou Stomacher.

1. Procedimento de eluição com a estação Filta-Max®.
 - 1.1 Primeira lavagem.
 - 1.1.1 Colocar a membrana filtrante plana na base do concentrador, com a parte rugosa para cima.
 - 1.1.2 Usar as travas da estação de lavagem para parafusar o tubo concentrador (criando uma vedação na membrana).
 - 1.1.3 Retirar o tubo concentrador da estação de lavagem.
 - 1.1.4 Remover o filtro de espuma do porta-filtro.
 - 1.1.5 Conectar o filtro de espuma à estação de lavagem.
 - 1.1.6 Verter o excesso de líquido recuperado a partir do módulo de filtração para o tubo concentrador, em seguida, lavá-lo com PBST e verter o líquido no tubo concentrador.
 - 1.1.7 Adicionar 600 mL de PBST no tubo concentrador e conectá-lo na base abaixo do tubo de eluição.

Nota: Se mais de 50 mL forem recuperados, diminuir a quantidade de PBST.

1.1.8 Lavar o filtro de espuma, movendo o êmbolo para cima e para baixo aproximadamente 20 vezes com movimentos suaves para evitar produção de muita espuma.

1.1.9 Separar o concentrado. Para purgar o líquido que ficou no tubo de eluição, mover o êmbolo para cima e para baixo mais ou menos 5 vezes, e rapidamente colocar o tampão na extremidade do tubo de aço para evitar que esorra.

1.1.10 Com o sistema FILTA-MAX®, concentrar a solução eluída na primeira lavagem. Posicionar o tubo concentrador sobre uma placa de agitação magnética e colocar a tampa, com a barra agitadora magnética.

1.1.11 Conectar o aparelho de drenagem à válvula na base do concentrador. Ligar o agitador e abrir a válvula.

1.1.12 Ligar a bomba a vácuo.

1.1.13 Deixar o líquido escoar até a uma altura aproximadamente igual ao meio da barra agitadora e fechar a válvula rapidamente.

1.1.14 Remover o agitador magnético e lavá-lo com PBST ou água reagente para recuperar todos os oocistos.

1.1.15 Transferir o concentrado para um tubo de 50 mL, lavar os lados do tubo de concentração e transferir o produto do enxágue para o tubo anterior de 50 mL.

1.2 Segunda lavagem

- 1.2.1 Colocar um volume adicional de 600 mL de PBST para o módulo concentrador.
- 1.2.2 Repetir a lavagem dos filtros de espuma, movendo o êmbolo para cima e para baixo 10 vezes, com movimentos para evitar a produção de espuma.
- 1.2.3 Adicionar o concentrado da primeira lavagem, armazenado no tubo de 50 mL, para o eluato (mistura de eluente e soluto) da segunda lavagem e repetir o processo de concentração da amostra com sistema Filta-Max®.

Nota: No caso de obstrução dos poros da membrana que dificulta o escoamento antes de finalizar a concentração, pode-se substituir a membrana filtrante. Desmontar o tubo concentrador e armazenar o eluato remanescente. Retirar a membrana com uma pinça, colocando-a no saco fornecido. Inserir uma nova membrana e remontar o tubo concentrador. Retornar o eluato armazenado ao tubo concentrador, lavar o recipiente com água reagente e adicionar o líquido ao eluato, prosseguir com a concentração. A membrana pode ser substituída sempre que necessário. Pode-se também realizar a concentração por centrifugação a 1500g por 15 minutos.

- 1.2.4 Remover o agitador magnético.
- 1.2.5 A amostra final pode ser vertida para dentro do mesmo tubo de 50 mL. Lavar os lados do tubo concentrador com PBST e verter a solução para o tubo de 50 mL.
- 1.2.6 Inserir o tubo concentrador vazio na estação de lavagem.
- 1.2.7 Retirar a membrana e transferi-la para o saco com uma pinça.
- 1.2.8 Lavar a membrana.

- 1.2.8.1 Manualmente - adicionar 5 mL de PBST no saco com a membrana. Esfregar a superfície da membrana através do saco até que fique limpa. Usar uma pipeta para transferir o produto de eluição a um tubo de 50 mL. Repetir a lavagem da membrana com outros 5 mL de PBST e transferir o produto para o tubo de 50 mL.
- 1.2.8.2 Lavagem com Stomacher - Adicionar 5 mL de PBST para o saco contendo a membrana. Colocar o saco com a membrana no Stomacher e agitar 3 minutos. Com pipeta transferir o eluato para um tubo de 50 mL. Repetir a lavagem duas vezes no Stomacher e com 5 mL de alíquotas de PBST.

E - Centrifugação

1. Centrifugar o tubo de 50 mL a 1500g durante 15 minutos.
2. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, aspirar cuidadosamente o sobrenadante até 5 mL acima do sedimento.
3. Registrar o volume do sedimento.

Nota: O volume do sedimento não deve ser superior a 0,5 mL, quantidade máxima recomendada de material particulado para purificação pelo método.

F - Separação imunomagnética

1. Agitar vigorosamente o tubo em vórtex para ressuspensão do sedimento:
 - 1.1 Se o volume de sedimento for inferior a 0,5 mL, agitar o tubo vigorosamente em vórtex até o sedimento ser completamente ressuspendido. Girar o tubo da centrífuga suavemente para reduzir a espuma formada após homogeneização.
 - 1.2 Se o volume do sedimento for superior a 0,5 mL, o concentrado deve ser separado em várias subamostras (uma subamostra não deve ter volume de sedimento superior a 0,5 mL).
 - 1.2.1 Estimar o volume total requerido usando o volume do sedimento pela fórmula:

$$\text{Volume total requerido (mL)} = \frac{\text{Volume de sedimento (mL)} \times 5,0 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}}$$

Exemplo: volume do precipitado = 1,2 mL.

Volume total necessário = 12 mL.

Adicionar água pura ao tubo de centrífuga para completar o volume de 12 mL.

- 1.3 Se todo o volume obtido for submetido ao IMS, deve-se dividir por 5 mL e calcular o número de subamostras a serem analisadas (arredondando para o número inteiro superior mais próximo).

No exemplo citado = $12/5 \text{ mL} = 2,4$ (=3 subamostras).

- 1.4 Se o volume a ser analisado for parcial, agitar vigorosamente o volume total em vórtex para ressuspender completamente o precipitado.

2. Preparar, para cada concentrado, 1,5mL de uma diluição 1X do tampão SL-A 10X. Para cada 1,0 mL requerido da solução diluída, misture 100 μ L (0,1 mL) e 900 μ L (0,9 mL) de água reagente.
3. Transferir, com o auxílio de uma pipeta de 10 mL, 5 mL da amostra concentrada (ou subamostra) para o tubo de Leighton (lado plano) contendo 1,0 mL de cada tampão, SL-A 10X e SL-B 10X (Dynabeads GC-Combo).
4. Enxaguar, duas vezes com água reagente, o tubo contendo o concentrado (ou subamostra), de modo que o volume final no tubo de Leighton seja de 12 mL.
5. Adicionar a cada tubo de Leighton com a amostra e tampões, 100 mL de Dynabeads®Crypto-Combo e 100 mL de Dynabeads®Giardia-Combo, previamente homogeneizados no vórtex por 10 segundos. Colocar os tubos no agitador rotatório por no mínimo 1 hora, a 18 rpm.
6. Transferir o tubo de Leighton para o concentrador magnético de partículas (MPC®1 ou MPC®6), homogeneizar, manual e suavemente, em um ângulo de aproximadamente 90° por 2 minutos.
7. Descartar o sobrenadante, sem retirar o tubo do concentrador magnético de partículas e sem agitar o material.
8. Se a amostra estiver turva, descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 mL de PBS e repetir o procedimento no concentrador magnético de partículas.
9. Remover o concentrador magnético de partículas e ressuspender a amostra em 500 μ L (0,50 mL) de tampão SL-A 1X utilizando pipeta Pasteur e transferir para um tubo eppendorf. Adicionar mais 500 μ L

de tampão SL-A1X ao tubo de Leighton, lavar bem e transferir para o tubo eppendorf. Colocar o eppendorf no MPC®-M ou MPC®-S, e homogeneizar manualmente em um ângulo de 180°C durante 1 minuto.

10. Para transferir, quantitativamente, todo o volume, aguardar, após a segunda transferência, cerca de um minuto e recolher qualquer volume residual que tenha escorrido para a parte inferior do tubo.
11. Descartar o sobrenadante, sem retirar o concentrador magnético.
12. Dissociação do complexo beads/oocisto.
13. Remover o concentrador magnético.
14. Adicionar 50 µL da solução de HCl 0,1N e agitar no vórtice a alta velocidade por cerca de 50 segundos.
15. Colocar o tubo no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S) sem a tira magnética no lugar e deixar repousar em posição vertical, por pelo menos 10 minutos, à temperatura ambiente.
16. Agitar no vórtice durante aproximadamente 30 segundos.
17. Assegurar que toda a amostra está na base do tubo. Colocar o tubo de microcentrífuga (eppendorf) no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S).
18. Colocar a tira magnética no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S) e deixar em repouso durante um mínimo de 10 segundos.
19. Preparar uma lâmina e identificá-la, adicionar 5 µL de NaOH 1,0 N ao poço da lâmina.
20. O procedimento envolve duas dissociações ácidas e podem ser montadas duas lâminas, colocando em cada uma o volume de uma das dissociações ou uma única lâmina. Caso se escolha montar uma única lâmina, adicionar 10 µL de NaOH 1,0 N ao poço da

lâmina. O volume do concentrado que foi adicionado deve ser bem medido.

21. O volume obtido da dissociação pode ser armazenado em outro Eppendorf com 10 µL de NaOH 1,0 N. Desse modo, pode-se realizar a leitura de uma menor alíquota do concentrado, e devem-se registrar os volumes do concentrado e da alíquota.
22. Sem remover o Eppendorf do concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S), transferir toda a amostra para o poço da lâmina com NaOH. Evitar tocar as partículas presas à parede do tubo. Conferir que todo o fluido seja transferido.
23. Remover o Eppendorf do concentrador magnético e repetir o procedimento de lavagem com ácido.
24. O volume da segunda dissociação ácida pode ser adicionado à lâmina contendo o volume da primeira dissociação ou pode ser montada uma segunda lâmina, como já dito anteriormente.

Nota 1: Os poços da lâmina podem ser pequenos para acomodar os volumes de ambas as dissociações.

Nota 2: As etapas de eluição, concentração e purificação (separação imonagnética) devem ser concluídas no mesmo dia de trabalho.

G - Coloração

1. Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente de um dia para outro (ou até que a lâmina seque completamente). Seguir as instruções do fabricante para efetuar a coloração imunofluorescente.

Nota: A coloração deve ser iniciada em até 72 horas após preparada a lâmina.

2. Colocar a lâmina numa câmara úmida, no escuro e à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. A câmara úmida consiste de um recipiente de plástico contendo toalhas de papel úmidas, sobre as quais as lâminas são colocadas.
3. Lavar os poços com PBS usando quantidade suficiente para tal (aproximadamente 100 μL). Aspirar cuidadosamente o líquido sem tocar a área contendo o material.
4. Adicionar 50 μL de DAPI e deixar em repouso durante 5 minutos na câmara úmida.
5. Lavar os poços, adicionando PBS em quantidade suficiente (aproximadamente 100 μL). Aspirar cuidadosamente o líquido, sem tocar a área contendo o material.
6. Colocar uma gota do meio de montagem DABCO/glicerol e cobrir com uma lamínula, evitando a formação de bolhas entre a lâmina e a lamínula.
7. Cuidadosamente, selar as bordas da lamínula com esmalte transparente.
8. Preparar lâminas de controles positivos e negativos, de acordo com as especificações do fabricante.

Nota: O exame microscópico deve ser iniciado tão logo a coloração tenha sido finalizada, mas se os corantes não perderem a fluorescência, pode ser realizado em até 168 horas (7 dias) com as lâminas armazenadas ao abrigo da luz.

H - Leitura no microscópio

1. Examinar cada poço de maneira sistemática, estabelecendo um padrão de leitura, de cima para baixo ou de um lado para outro, garantindo que toda a área seja avaliada.

2. Examinar usando imunofluorescência (FA), DAPI e microscopia de Contraste por Interferência Diferencial (DIC).

I - Controles positivo e negativo

1. Iniciar o exame pelos controles positivo e negativo, identificando no controle positivo pelo menos três oocistos de *Cryptosporidium* e três cistos de *Giardia*. Examinar o controle negativo, confirmando a ausência de cistos e oocistos.
2. Registrar os resultados e iniciar a leitura das amostras somente se os controles positivos e negativos apresentarem resultados satisfatórios.
3. Oocistos de *Cryptosporidium*
 - 3.1 Examinar em FITC com aumento de 200X. São oocistos formas fluorescentes ovoides ou esféricas de 4 a 6 μm de diâmetro.
 - 3.2 Ao visualizar os oocistos, ampliar para 400X e mudar o microscópio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Os oocistos característicos apresentam coloração interna azul brilhante ou presença de até 4 núcleos de coloração azul céu.
 - 3.3 Em seguida, examinar com contraste interferencial-diferencial e observar a presença de características morfológicas internas e externas típicas de oocistos de *Cryptosporidium*, com aumento de 1000X.
 - 3.4 Um resultado positivo de oocisto *Cryptosporidium* exibe fluorescência, tamanho e formas típicas, e positivo para Fluorescência-FITC, DAPI; Contraste de interferência- diferencial-DIC.

4. Cistos de *Giardia*

- 4.1 Examinar em FITC em aumento de 200X. São cistos característicos, formas fluorescentes ovoides ou esféricas de 8 a 18 µm de diâmetro e 5 a 15 µm de largura.
- 4.2 Ao visualizar os cistos, ampliar para 400X e mudar o microscópio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Os cistos característicos apresentam coloração interna azul brilhante ou presença de dois a 4 núcleos de coloração azul céu.
- 4.3 Em seguida, examinar em contraste interferencial - diferencial e observar as características morfológicas internas e externas típicas de cistos de *Giardia*.
- 4.4 Um resultado positivo para cisto de *Giardia* é a fluorescência típica, tamanho e forma típica e não exibe características atípicas em FA, DAPI ou DIC.

5. Cálculo dos resultados

Cálculo para quando todo o volume concentrado (do final dissociação ácida) é observado ao microscópio em uma única vez:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de (oo)cistos. L}^{-1} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de (oo)cistos identificados}}{\text{Volume da amostra coletada}}$$

Interferentes que alteram os resultados

Turbidez: influencia negativamente nas etapas de concentração e separação do material particulado dificultando a leitura e identificação microscópica.

Detritos e organismos com imunofluorescência: interferem na identificação dos oocistos e cistos por apresentar resultados falsos positivos.

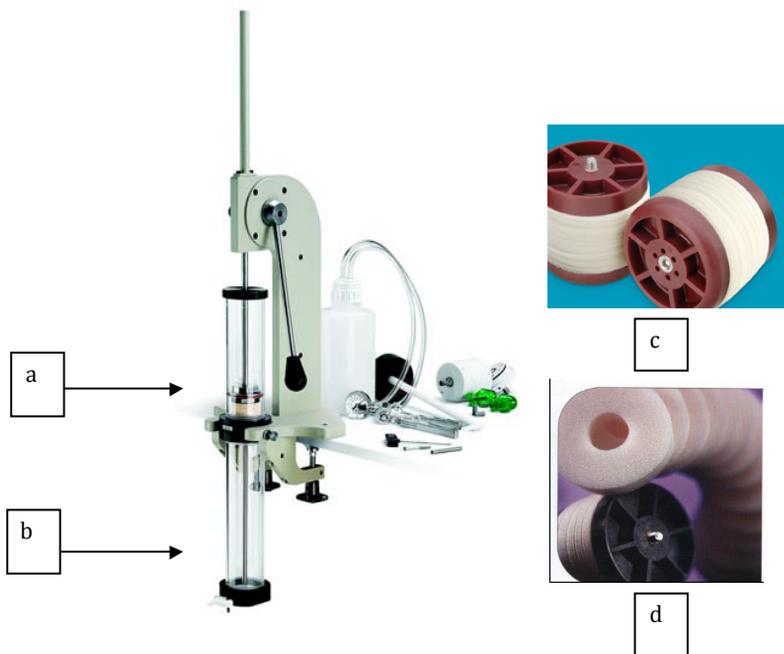
Contaminação: solventes, reagentes, e resíduos de cada etapa anterior ou presentes em tubos e ponteiras mal autoclavados são contaminantes para as etapas seguintes interferindo nos resultados. Para controlar a presença de interferentes, cada etapa deve ter seu branco, ou seja, seu controle negativo. Recomenda-se usar material descartável para evitar esse tipo de contaminação.

Inexperiência no laboratório: a técnica descrita e a identificação microscópica de cistos e oocistos exige alta capacidade do técnico; e este deve receber treinamento específico desde a etapa de preparação do material de vidro, e sobre cuidados, manutenção e uso dos equipamentos, incluídos os microscópios e as colorações específicas.

A Figura 1 mostra as etapas da técnica. Foram extraídas do trabalho de Martins et al. (2009), apresentado no 25^o Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental realizado em Recife-PE em 2009.

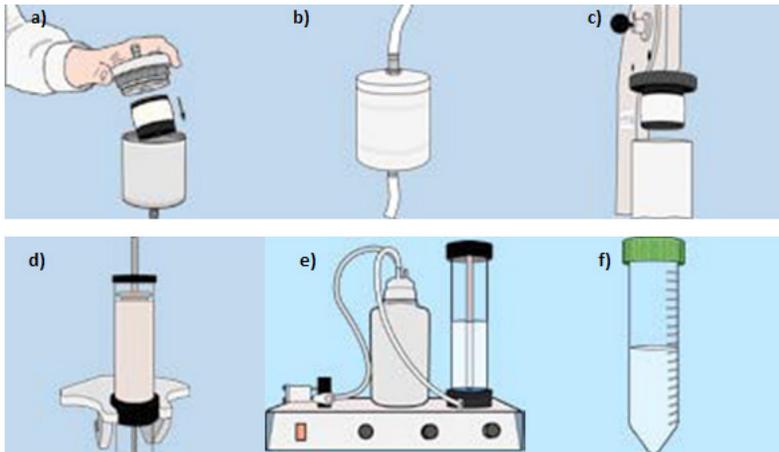
As Figuras 1 e 2 mostram detalhes do Sistema FILTA MAX - IDEXX recomendado pela USEPA (2005) para a concentração e eluição de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp.

Figura 1 – Sistema FILTA MAX. (IDEXX) a) tubo superior, onde se coloca o módulo de filtro em espuma (seta superior) sem as tampas de contenção após concentrar a amostra para iniciar a eluição com PBST; b) tubo inferior, que recebe o líquido eluído e se procede à sua concentração; c) módulo de filtração de espuma compactado; d) filtro de espuma expandido para eluição.



Fonte: IDEXX – Filta Max (2015).

Figura 2 - Uso do FILTA MAX: a) colocação do filtro de espuma compactado dentro do suporte do filtro; b) suporte de filtro com filtro de espuma pronto para efetuar a filtração e concentração da amostra (Figura 4); c) colocação do filtro de espuma após a concentração da amostra dentro do tubo superior da estação de lavagem FILTA MAX fixado na tampa superior para permitir a expansão do filtro de espuma; d) lavagem (eluição) do concentrado com tampão de eluição, com movimentação do êmbolo pelo menos 5 vezes; e) concentração do eluato; f) material concentrado. Repetir os passos para concentrar o volume final em 25 mL



Fonte: IDEXX – Step by step guide to using FILTA MAX (adaptado) (2015).

Referências

BASSO, R. M. C. et al. *Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. Rev. Soc Bras Med Trop.*, n. 41, p. 263-268, 2008.

BEVILACQUA, P. D.; AZEVEDO, S. M. F. O.; CERQUEIRA, D. A. Microorganismos Emergentes: protozoários e cianobactérias. In: Valter Lucio de Pádua (Org.). **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento da água:**

Panorama Mundial e Ações do PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, v. 01, p. 74-108. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 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**, Brasília, n. 59, p.266-270, Seção I, 26 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano nacional de Vigilância e controle das Enteroparasitoses**. 2005. Disponível em: <http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/enteroparasitoses_pano_nacional.pdf>. Acesso em 22 de novembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 22 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**. 4. ed. Brasília: FUNASA, 2013. 150p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CAREY, M. C.; LEE, H.; TREVORS, T. J. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v.38, p.818-862, 2004.

CIMERMAN, B.; CIRMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

CLASEN T. F. et al. **Interventions to improve water quality for preventing diarrhea (Review)**. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006, Issue 3. The Cochrane Collaboration. London: John Wiley & Sons, Ltd. 2009. Disponível em: <<http://info.onlinelibrary>.

wiley.com/userfiles/ccoch/file/CD004794.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2015.

COTTON, J. A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections. **Int. J. Parasitol.**, n.41, p.925-33, 2011.

CRAUN, G. F. Causes of waterborne outbreaks in the United States. **WaterSci. Technol.**, v.22, p.89-98,1990.

CUTOLO, S. A.; ROCHA, A. A. Correlação entre a microfauna e as condições operacionais de um processo de lodos ativados. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL 27. Porto Alegre, RS, **Anais...** Rio de Janeiro; ABES, 2000.

DE LEON, R.; NARANJO, J. E.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. Enterovirus, Cryptosporidium and Giardia monitoring of wastewater reuse effluent in Arizona in: Implementing Water Reuse, Symposium IV. **Am. Water Works. Assoc.**, Denver, CO., p. 846. 1988.

DUPONT, H. L.; CHAPPEL, C. L.; STERLING, C.R. et al. The infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy volunteers. **N. Engl. J. Med.**, v.332. p.855-859, 1995.

FERREIRA, M. U.; FERREIRA, C. S.; MONTEIRO, C. A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Ver. Saúde Pública**, n.34, p.73-82, 2000.

FERREIRA H. et al. Estudo epidemiológico localizado da frequência e fatores de risco para enteroparasitoses e sua correlação com o estado nutricional de crianças em idade pré-escolar. **Publ. UEPG CiBiol. Saúde**, Ponta Grossa, n.12, p.33-40, 2006.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. Parasitologia Ambiental: métodos de concentração e detecção de Cryptosporidium spp e spp em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n.2, p.119-135, abr./jun. 2012.

GAMBA, R. C.; CIAPINA, E. M. P.; BATELLO, E. R.; ESPINDOLA, R. S.; SILVA, A. L. B.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V. H. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em água de poços utilizados para consumo em Itaquaquecetuba, SP. *Rev., Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 32, p. 222-241.1997.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is Giardia a significant pathogen in production animals? *Exp. Parasitol.*, n.124, p.98-106, 2010.

HACHICH, E. M. et al. Giardia and Cryptosporidium in source waters of São Paulo State, Brazil. *Wat Sci Tech.*, n.50, p.239-245, 2004.

IDEXX. FILTA MAX MATERIALS. Disponível em: <<http://www.iberlab.pt/destaques/filtamax.pdf>> . Acesso em 25 nov. 2015.

IDEXX. Sistema FILTA MAX. Disponível em: <<http://www.sovnet.com.br/Products/523-filta-max.aspx>> . Acesso em 25 nov. 2015.

IDEXX. Step by Step to using FILTA MAX; Disponível em: <<https://www.idexx.com/water/products/filta-max.html>>. Acesso em 15 jun. 2015.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*, n.5, p.1-38, 2007.

LOPES, A. M. M. B. **Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. e sua associação com indicadores bacteriológicos e turbidez na represa de Vargem das Flores – MG.** 109f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

MARTINS, F. C.; BATISTA, A. M. M.; CERQUEIRA, D. S. et al. Identificação e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em águas brutas e tratadas – Prós e contras do Método 1623 da USEP. CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO

BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife/. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2009.

McCUIN, M. R.; CLANCY, L. J. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p. 267-274, 2002.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.331, n.3, p.161-167, 1994.

MADORE, M.S.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. **J. Parasitol.** v.73, n.4, p.702-705, 1987.

MEISEL, J.L. et al. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterol.** v.70, n.6, p.1156-60, 1976.

MULLER, A. P. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana do estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2000, 198p.

NASH, T. E.; OHL, C. A.; THOMAS, E. et al. Treatment of patients with refractory giardiasis. **Clin. Infect Dis.** N.32, p.22-28, 2001.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana.** 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NEWMAN, R. D.; ZU, S.X.; WUHIB, T.; LIMA, A .A.; GUERRANT, R. L. SEARS, C. L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. **Ann. Intern. Med.**, n. 120, p. 500-505, 1994.

NIME, F. A. et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterol.** v.70, n.4, p.592-8, 1976.

- QUADROS, R. M. et al. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, n.34, p.422-423, 2004.
- ROBERTSON, L. J. et al. Giardiasis: Why do the symptoms sometimes never stop? **Trends Parasitol.** v. 26, p.75-82, 2010.
- ROSE, J. B. Occurrence and Control of Cryptosporidium in Drinking Water. In: **Drinking water Microbiol.** New York, Springer-Verlag, p.294-321,1990.
- SANTANA, L. A.; VITORINO, R. R.; ANTONIO, V. E. et al. Atualidades sobre giardiase. **JBM**, v.102, n.1, jan./fev. 2014.
- SATURNINO, A. C. R. D. Enteroparasitoses em escolares de 1º grau da rede pública da cidade de Natal, RN. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, n.37, p.83-85, 2005.
- SMITH, A. et al. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol Infect**, n.134, p.1141-1149, 2006.
- SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. **Parasitol. Today**, n.14, p.14-22, 1998.
- THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B.P. Genetic variation in Giardia Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. **Protozool. Abstracts**, n. 14, p.1-28, 1990.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 894p.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Recursos Hídricos no Século XXI: Oficina de Textos**, 2011. 328 p.
- UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4. ed. Churchill Livingstone, p. 2500-2510. 1995.
- USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA**. 2005. Disponível em: <<http://water.epa.gov/>

scitech/methods/cwa/bioindicators/cryptsum. cfm>. Acesso em: 10 out. 2015.

WHO. World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. **Intestinal Parasites Control**. Geographical Distribution 2006. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/html/intestburtre.html>. Acesso em 25 set. 2015.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 2. ed. Geneva: WHO, 2004, 515p.

Sobre o livro

Capa	Erick Ferreira Cabral
Projeto Gráfico e Editoração	Jéfferson Ricardo Lima Araujo Nunes
Revisão Linguística	Elizete Amaral de Medeiros
Tipologias Utilizadas	Myriad Pro 14 pt Philosopher 12 pt
Impressão	Gráfica da UEPB