

## COMPARAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA EM LOCAIS COM DIFERENTES OCUPAÇÕES DE SOLO

Viviany Guimarães SARMENTO<sup>1</sup>  
Domitila PASCOALOTO<sup>2</sup>  
Soraya Rondon PIRANGY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PAIC/FAPEAM;  
<sup>2</sup>Orientadora CDAM/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora CDAM/INPA.

### INTRODUÇÃO

A água pode estar associada a diversos casos de doenças e de riscos à saúde pública, considerando que a forma comum, e talvez a mais antiga, de poluir é pelo lançamento de dejetos humanos e de animais domésticos em rios, lagos e mares (Amabis e Martho 2004). Desta forma, o controle da qualidade da água antes do seu consumo é essencial, e para a garantia de sua qualidade devem ser feitas análises que buscam indicar a contaminação por material de origem fecal. Os microrganismos mais usados para a determinação de contaminação fecal são as bactérias do grupo coliformes totais, que tem como subgrupo os coliformes termotolerantes (Hachich 2008; Marquezi 2010), nos quais está incluída a *Escherichia coli*.

Durante muitos anos o grupo coliforme foi a ferramenta básica utilizada pelos sanitaristas na detecção de contaminação fecal no ambiente aquático. As principais características pela sua seleção como o melhor indicador de contaminação fecal foram ocorrência dessas bactérias em grande concentração nas fezes e sua associação frequente com a presença de patógenos. No entanto, a generalidade da definição proposta para esse grupo, englobando todos os bacilos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos e que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 horas, a 35 °C, comprometeu a utilização destas bactérias como indicador específico de contaminação fecal (CETESB 1993; Hachich 2008). Adotada em 1917, essa definição deu margem a que fossem incluídos nesse grupo, além da *Escherichia coli*, outros gêneros de coliformes cuja origem não é exclusivamente fecal (CETESB 1993). O reconhecimento desse fato levou ao desenvolvimento de métodos para a enumeração de um subgrupo dos coliformes, denominados coliformes fecais, sendo a base para a diferenciação dos mesmos a verificação de sua capacidade de fermentação da lactose em temperatura elevada (44,5 °C).

Embora a utilização dos coliformes fecais, em substituição aos coliformes totais, tenha determinado uma melhoria significativa na determinação da contaminação de origem fecal, logo se tornou evidente a existência de outros coliformes termotolerantes, principalmente *Klebsiella*, os quais, por não serem de origem exclusivamente fecal, comprometiam a especificidade desse subgrupo para a finalidade da proposta (CETESB, 1993). Somente *E. coli* é de origem exclusivamente fecal, estando sempre presente, em quantidades elevadas, nas fezes de humanos, mamíferos e pássaros, sendo raramente encontrada na água ou solo que não tenham recebido contaminação fecal (Hachich 2008).

O método convencional para análise de coliformes totais e fecais é o do Número Mais Provável, também conhecido como tubos múltiplos (CETESB 1993; Hachich 2008). Além desse método, para cada análise, ocupar um espaço considerável nas estufas, requer vários reagentes e são necessários em média cinco dias para se ter o resultado dos coliformes fecais. A necessidade de rapidez dos resultados de análise, fez surgir, assim, os métodos rápidos de análise microbiológica. Os métodos rápidos possuem várias vantagens, como diminuição

de custos para a empresa, facilidade de leitura e interpretação dos resultados, bem como, simplificação de tarefas (Goldbeck 2008).

O presente estudo comparou a eficiência de dois métodos de avaliação rápida em relação ao convencional para determinação de coliformes totais e fecais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras de água para exames bacteriológicos

Na análise microbiológica da água é essencial que a amostragem seja realizada com precaução e técnica para evitar todas as fontes de possível contaminação. As amostras devem ser coletadas em frascos de vidro branco, boca larga, com tampa de vidro esmerilhada, bem ajustada, capacidade de 100 mL, previamente esterilizados (APHA 2005).

Em cada sítio amostral foram coletadas amostras de água que foram acondicionadas em 3 frascos (80 ml de água/frasco). Os frascos foram mantidos sob refrigeração e transportados para o laboratório de Limnologia/Bacteriologia do INPA para realização das análises em até 24 horas (APHA 2005).

*Tubos múltiplos:* o ensaio presuntivo consiste em inoculação de amostras em meio caldo lactose que são incubados a  $35 \pm 0,5$  °C, durante 24-48 horas, ocorrendo enriquecimento de organismos fermentadores da lactose, com ou sem produção de gás, decorrente da fermentação da lactose de meio de cultura empregado nesse ensaio. Foram utilizados dois meios de cultura, Verde Bile Brilhante (BB) para determinação de coliformes totais e o meio EC para coliformes fecais ou termotolerantes. A densidade de coliformes é expressa como Número Mais Provável (NMP) de coliformes por 100 mL, o qual é obtido através de uma tabela estatística. Os resultados são expressos como: NMP/100 mL de coliformes totais e NMP/100 mL de coliformes fecais. Os meios foram preparados com 96 horas (teste presuntivo) a 24 horas (teste confirmativo) de antecedência ao início das análises. Antes de se proceder à coleta de água também foi esterilizado, em autoclave, todo o material que seria utilizado nas análises biológicas (tubos de ensaio, tubos de Durhan, frascos de vidro, bastão de vidro) (CETESB 1993; APHA 2005).

*Substrato Cromogênico* (marca: Colitag): foi adicionado um frasconete contendo o substrato cromogênico em 90 ml na amostra coletada, agitar e incubar a  $35,0 \pm 0,5$ °C. Após 24 horas retirar e observar se apresentar coloração amarelada, o resultado é presença de Coliformes totais na amostra. Utilizando uma lâmpada com luz UV-365 observar se a amostra apresentar fluorescência azul que desenvolveram coloração amarelada aproximando a lâmpada, significa que há presença de *Escherichia coli* na amostra. Caso a amostra permaneça transparente, o resultado é negativo.

*Kit Potabilidade* (marca: Alfakit- Colipaper): *Colipaper* é uma cartela com meio de cultura em forma de gel desidratado. A cartela foi retirar do plástico tocando apenas acima do picote, emergir na amostra retirando o excesso de água e recolocando a cartela na embalagem plástica retirando a parte do picote sem tocar no restante, em seguida levar na micro-estufa, colocar no máximo 4 cartelas e aguardar por 15 horas em temperatura de 36 °C. Não ultrapassar o tempo de 15 horas para não manchar a cartela. Coliformes Fecais são os pontos violetas a azuis e Coliformes Totais são róseos a vermelho. Multiplicar a média de acordo com

o valor de correção das cartelas (o valor de correção das cartelas é de 80). E multiplicar para resultado em UFC/ 100 mL.

### **Locais de Estudo**

Foram selecionados três locais para a realização do estudo, com sítios amostrais escolhidos conforme a atividade (uso do solo) e/ou característica hidrológica.

Na Reserva Ducke foi selecionado o Igarapé Barro Branco com quatro sítios amostrais denominado: campo, antes da piscina, dentro da piscina e depois da piscina.

No INPA foram selecionados quatro sítios no Bosque da Ciência, os sítios amostrais analisados foram: Ilha da Tanibuca, tanque de número 3 (três) do Peixe-Boi, lago do Poraquê e Lago Amazônico, as coletas foram realizadas nos dias 01 de dezembro de 2015, 13 de janeiro de 2016, 20 abril 2016.

No rio Negro quatro sítios amostrais na orla da cidade foram selecionados: Ponta Negra/Praia, no Hotel Tropical, Terminal Ajato/ Rodoway, Manaus Moderna e Ceasa, as amostras analisadas foram coletadas no dia 04 de dezembro de 2015, 17 fevereiro de 2016 e 25 abril de 2016, diretamente ou com auxílio de garrafa coletora (que foi limpa com água sanitária e em seguida enxaguada com água destilada antes de cada coleta foi verificado a precipitação em Manaus um dia antes das coletas.

O presente estudo comparou a eficiência do substrato cromogênico e de um kit avaliação rápida em relação ao convencional para determinação de coliformes totais e fecais.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O resultado das análises obtido para presença e ausência de coliformes fecais e/ou totais, em todos os sítios amostrais estudados pelo método substrato cromogênico, (Rio Negro, Bosque da Ciência e Barro Branco) confirmam a presença de coliformes fecais e/ou totais, exceto nos sítios amostrais Bosque da ciência-Poraquê, no mês de Dezembro e Tanibuca no mês de Janeiro.

Para a comparação dos resultados obtidos através dos métodos Tubos Múltiplos, e cartelas contendo meio de cultura em forma de gel desidratado, foram feita a transformação logarítmica na base dez dos dados obtidos.

### **Bosque da Ciência**

Não foram observados coliformes fecais e/ou totais no sítio amostral Lago do Poraquê no mês de Dezembro e Ilha Tanibuca no mês de janeiro, no sítio amostral Poraquê no mês de janeiro a cartela contendo meio de cultura apresentou uma quantidade maior para coliformes totais que o método dos tubos múltiplos, nos outros sítios analisados o método dos tubos múltiplos apresentou um número maior de coliformes fecais e/ou totais que as cartelas (Figuras 1 e 2).

### **Rio negro**

Segundo o INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), a precipitação no município de Manaus-AM nos dias 03 de dezembro foi de 20 mm, 16 fevereiro de 2016 foi de 0,0 mm, 24 de abril de 2016 foi de 14 mm.

Foram observados Coliformes Totais e/ou fecais em todos os sítios amostrais analisados utilizando metodologias dos tubos múltiplos e cartela contendo meio de cultura, a maior diferença entre os resultados ocorreu nos sítios amostrais: Terminal Ajato e Manaus Moderna no mês de fevereiro de forma que o Número Mais Provável é maior que as Unidades Formadoras de Colônias (Figuras 3 e 4).

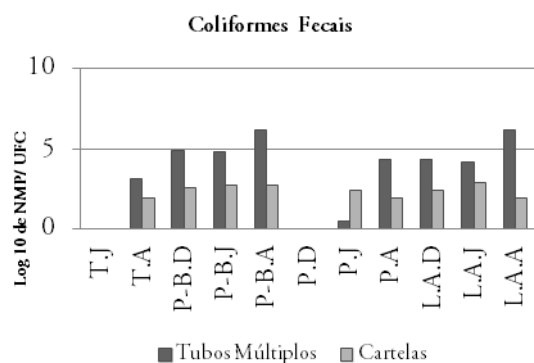


Figura 1. Tanibuca mês Janeiro (T.J); Tanibuca mês Abri (T.A); Peixe-Boi mês dezembro (P-B.D); Peixe-Boi mês janeiro( P-B.J), Peixe-Boi mês abril (P-B); Poraquê mês dezembro( P.D); Poraquê mês de janeiro (P.J); Poraquê mês de abril( P.A); Lago Amazônico mês dezembro (L.A.D); Lago Amazônico mês janeiro (L.A.D); Lago Amazônico mês abril (L.A.A).

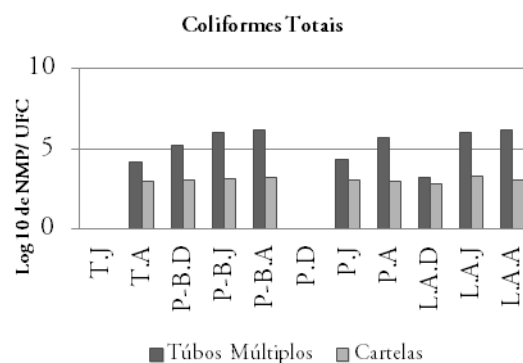


Figura 2. Tanibuca mês Janeiro (T.J); Tanibuca mês Abri (T.A); Peixe-Boi mês dezembro (P-B.D); Peixe-Boi mês janeiro( P-B.J), Peixe-Boi mês abril (P-B); Poraquê mês dezembro( P.D); Poraquê mês de janeiro (P.J); Poraquê mês de abril( P.A); Lago Amazônico mês dezembro (L.A.D); Lago Amazônico mês janeiro (L.A.D); Lago Amazônico mês abril (L.A.A).

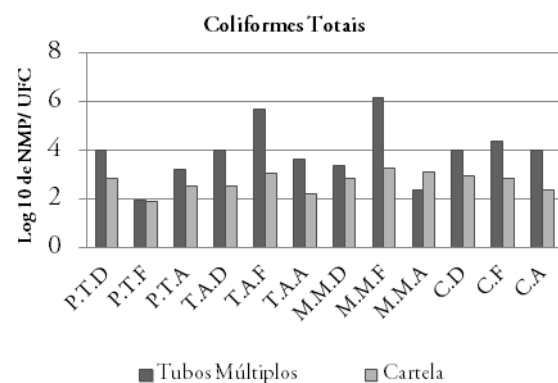


Figura 3. Pier Tropica dezembro (P.T.N); Pier tropical fevereiro (P.T.F); Pier tropical abril (P.T.A); Terminal Ajato dezembro( T.A.D), Terminal Ajato fevereiro ( T.A.F); Terminal Ajato abril (T.A.A); Manaus Moderna novembro (M.M.N); Manaus Moderna fevereiro (M.M.F); Manaus Moderna abril (M.M.A); Ceasa novembro (C.A); Ceasa fevereiro (C.F); Ceasa abril (C.A).

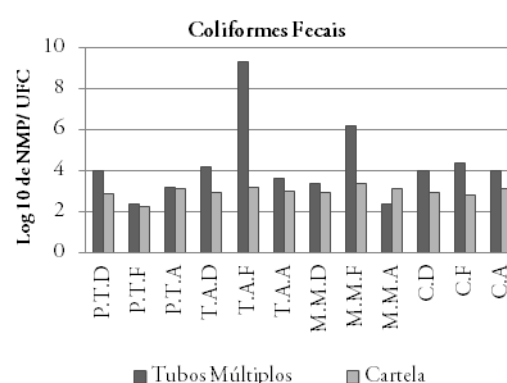


Figura 4. Pier Tropica dezembro (P.T.N); Pier tropical fevereiro (P.T.F); Pier tropical abril (P.T.A); Terminal Ajato dezembro( T.A.D), Terminal Ajato fevereiro ( T.A.F); Terminal Ajato abril (T.A.A); Manaus Moderna novembro (M.M.N); Manaus Moderna fevereiro (M.M.F); Manaus Moderna abril (M.M.A); Ceasa novembro (C.A); Ceasa fevereiro (C.F); Ceasa abril (C.A).

### Igarapé Barro Branco- Reserva Adolpho Ducke

O primeiro ensaio com as cartelas foi realizado no mês de outubro/2015, utilizando as amostras do Igarapé Barro Branco, porém o tempo de 15 horas foi ultrapassado dentro da micro-estufa, manchando as cartelas de azul e vermelho de forma que foi possível, apenas, confirmar, a presença de coliformes fecais e/ou totais. Segundo os dados obtidos através da estação Meteorológica da Reserva Adolpho Ducke, a precipitação um dia antes das coletas no dia 10 de novembro de 2015 foi de 0,0mm, 06 de março de 2016 foi de 14,8mm, 19 de abril 2016 29,2mm.

Foram observados Coliformes Totais e/ou fecais em todas as amostras analisadas dos sítios estudados, não houve diferença significativa entre os métodos analisados, conforme as Figuras 5 e 6.

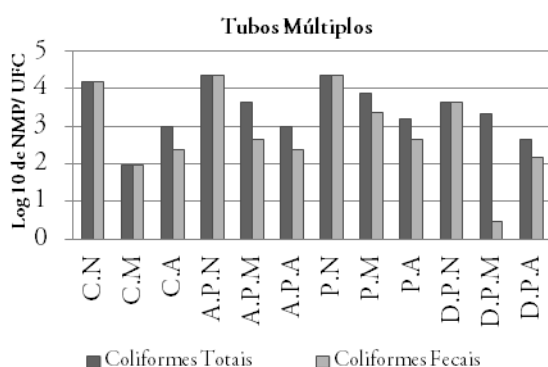


Figura 5. Campo novembro (C.N); campo março (C.M); Campo abril (C.A); antes do piscina novembro(A.P.N) antes do piscina março (A.P.M); antes do piscina abril(A.P.A); piscina novembro (P.N); piscina março (P.M); piscina abril (P.A); depois da piscina novembro (D.P.N); depois da piscina março (D.P.M); depois da piscina abril (D.P.A).

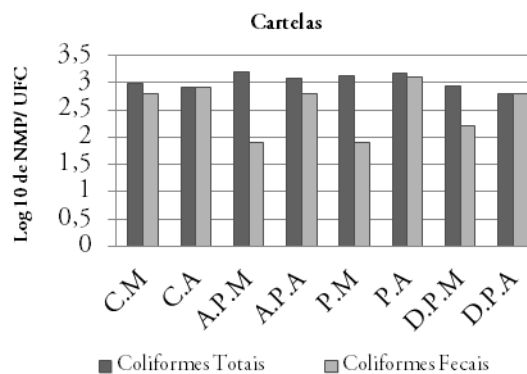


Figura 6. Campo março (C.M); Campo abril (C.A); antes do piscina março (A.P.M); antes do piscina abril(A.P.A); piscina março (P.M); piscina abril (P.A); depois da piscina março (D.P.M); depois da piscina abril (D.P.A).

## CONCLUSÃO

Os três métodos foram compatíveis no que se refere à presença e ausência de coliformes totais fecais. Apenas dois foi possível mensurar. Aparentemente houve conformidade entre os resultados de NMP e UFC (gráficos). No entanto, o coeficiente de correlação entre as duas técnicas foi fraco, o que possivelmente poderá ser corrigido aumentando o número de amostragens, além de avaliar cada grupo de ambientes individualmente.

## REFERÊNCIAS

- American Public Health Association –APHA; American Water Work Association – AWWA; Water Pollution Control Federation – WPC. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, American Public Health Association, 21ª edição. CD-ROM.
- Amabis, J.M.; Martho, G.R. 2004. *Biologia das Populações - Genética, Evolução e Ecologia*. Vol. 3. Ed. Moderna, 528p.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. 1993. Norma L5.262. *Coliformes totais e fecais: determinação pela técnica dos tubos múltiplos*. CETEB, São Paulo, São Paulo. 39p.
- Goldbeck J.C.; 2008. *Métodos rápidos de análise microbiológica*. Bacharelado em Química de Alimentos Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul. 10p.
- Hachich, E.M. (Coord.). 2008. *Análises microbiológicas da água*. V.1. CETESB, São Paulo, São Paulo. 131p.
- Marquezi, M.C.; 2010. *Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água*. Dissertação de Mestrado (Catálogo USP), São Paulo, 1p.