

## COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Tayanne do Nascimento Cunha<sup>1</sup>; Domitila Pascoaloto<sup>2</sup>; Soraya Rondon Pirangy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPCR /INPA; <sup>3</sup>Colaboradora CPCR/INPA

### 1. Introdução

Uma série de doenças pode ser transmitida, direta ou indiretamente, pela água, e são denominadas doenças de veiculação hídrica. Uma das estratégias mais viáveis para o controle da qualidade microbiológica da água é a avaliação da presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal, que pode ser realizada através de métodos laboratoriais simples, rápidos e de baixo custo, acessíveis a laboratórios com poucos recursos humanos e materiais. Por outro lado, a detecção de microrganismos patogênicos, embora necessária em algumas circunstâncias, não é aplicável para fins de monitoramento ou verificação de rotina (Hachich, 2008). Os indicadores sanitários mais utilizados são as bactérias do grupo coliformes, principalmente os fecais ou, na ausência desses, os termotolerantes.

Coliformes termotolerantes são definidos como microrganismos do grupo coliforme capazes de fermentar a lactose a 44-45°C, sendo representados principalmente pela *E. coli*, também, por algumas bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, entre outros (CETESB, 1990; Hachich, 2008). Durante muitos anos o grupo coliforme foi a ferramenta básica utilizada pelos sanitaristas na detecção de contaminação fecal no ambiente aquático, tendo sido a ocorrência dessas bactérias em grande concentração nas fezes e sua associação freqüente com a presença de patógenos, as características desse grupo, responsável pela sua seleção como o melhor indicador de contaminação fecal. Adotada em 1917, a definição deu margem a que fossem incluídos nesse grupo, além da *Escherichia coli*, outros gêneros de coliformes cuja origem não é exclusivamente fecal (CETESB, 1990). 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, 1990). 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. Os demais podem ocorrer em águas com altos teores de matéria orgânica, como, por exemplo, efluentes industriais, ou em material vegetal e solo em processo de decomposição (Hachich, 2008).

Neste estudo foram comparados os resultados obtidos utilizando-se a técnica do número mais provável (também conhecida por "tubos múltiplos") e a da membrana filtrante para determinação de coliformes termotolerantes em amostras provenientes de rios e igarapés dos municípios de Manaus e de São Gabriel da Cachoeira.

### 2. Material e Métodos

Foram analisadas amostras provenientes de dois (02) sítios amostrais no **rio**, no período de águas altas (maio), e de um (1) sítio amostral no rio Negro (Ceasa) e um (1) no igarapé do Quarenta (Seduc) no município de Manaus/AM, nos períodos de águas baixas (fevereiro) e águas altas (junho). Também foi realizada uma coleta de água nos dois sítios amostrais de Manaus para avaliar a eficiência de um sistema de filtração de água em desenvolvimento no Laboratório de Celulose, Papel/Carvão Vegetal da CPPF/INPA.

As determinações de bactérias do grupo coliforme foram feitas pela técnica dos tubos múltiplos (APHA et al., 2005) e pela técnica de membrana filtrante (APHA et al., 2005).

Para análise bacteriológica da água foram utilizados frascos de vidro, com capacidade para 100 ml, previamente limpos, esterilizados e autoclavados. O transporte das amostras para o setor de bacteriologia do Laboratório de Química Ambiental - LQA da CPCR/INPA foi feito em caixas isotérmicas (isopor) contendo cubos de gelo, mantidos até o início do exame. O período decorrido entre a coleta das amostras de água foi no máximo, de vinte e quatro horas, conforme estabelecido para as técnicas do número mais provável (também conhecida por "tubos múltiplos") e da membrana filtrante (APHA, 2005). As amostras de água em São Gabriel da Cachoeira foram coletadas por pesquisadores do INPA em maio; enviadas, sob refrigeração, por avião no mesmo dia e encaminhadas para o setor de microbiologia, onde começaram a ser analisadas, respeitando-se o limite de até 24 horas (APHA, 2005).

No período de águas altas, nos sítios amostrais de Manaus, também foram coletados cinco (5) litros de água, que passaram pelo sistema de filtração em desenvolvimento no Laboratório de Celulose, Papel e Carvão Vegetal da CPPF. Após a filtração da água de cada local, foram coletadas duas amostras para serem submetidas as mesmas técnicas de determinação de bactérias do grupo coliformes.

As amostras submetidas a técnica do número mais provável (também conhecida por "tubos múltiplos") foram utilizadas integrais, enquanto as utilizadas na técnica da membrana filtrante foram diluídas com água destilada na proporção 1:100.

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes em uma dada amostra é efetuada a partir de aplicação de tubos múltiplos. Esta técnica está baseada em que as bactérias presentes em uma determinada amostra podem ser separadas uma das outras por agitação resultando uma suspensão de células bacterianas individuais, uniformemente distribuídas na amostra original, consistindo volumes decrescentes na inoculação das amostras, em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo em cada volume inoculado em série de tubos (APHA 2005, Hachich, 2008). 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.

A técnica da membrana filtrante baseia-se na filtração de um volume conhecido da amostra (ou diluições da mesma) através de uma membrana filtrante estéril com porosidade adequada (0,45 µm porosidade e 47 mm de diâmetro). A filtração é realizada com um aparelho que consta de um funil de filtração com tampa, suporte de membrana e frasco receptor (APHA, 2005; Hachich, 2008). As bactérias a serem detectadas, apresentando dimensões maiores, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual é então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial. Por capilaridades, o meio difunde-se para a membrana, que em contato com as bactérias, desenvolvem-se colônias com características típicas, que poderão ser observadas e contadas. Conforme o meio utilizado, serão contadas as colônias de coliformes totais, termotolerantes ou fecais.

Para calcular a densidade das colônias, em 100 ml da amostra filtrada, aplica-se a fórmula geral:

$$\text{Nº de colônias de coliformes totais / 100 mL} = \frac{\text{Nº de colônias típicas} \times 100}{\text{Volume filtrado da amostra (ml)}}$$

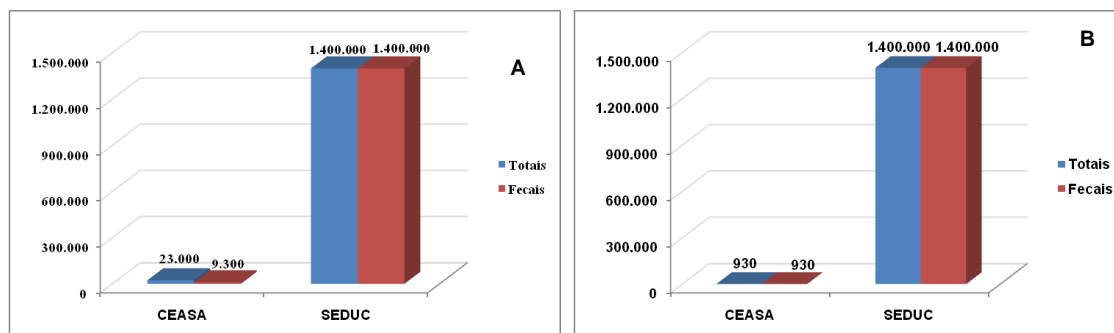
O resultado é expresso em Número de Colônias de Coliformes Totais em 100 ml (NMP/100 ml).

Para realização das análises pela técnica da membrana filtrante no igarapé do Quarenta, no período seco foi necessário trabalhar com amostras diluídas (com água destilada), na proporção 1:100. Para a técnica de membrana filtrante ambas as amostras, em ambos os períodos, foram diluídas também na proporção 1:100.

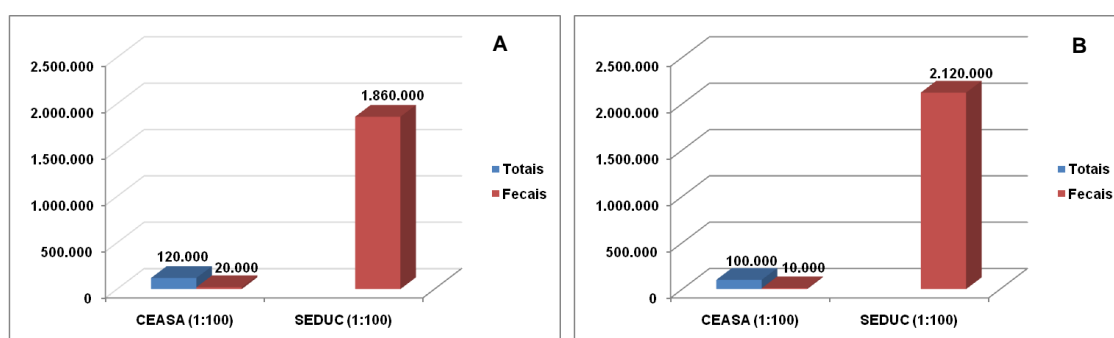
### **3. Resultados e discussão**

Este foi o primeiro estudo realizado na região para comparação dessas duas técnicas de determinação de bactérias do grupo coliformes, também foi a primeira vez que a técnica da membrana filtrante foi utilizada para o igarapé do Quarenta e para o rio Negro.

Não foram observadas bactérias do grupo coliformes nas amostras provenientes do rio Negro. Resultado semelhante foi observado por Pascoaloto et al. (2009) e Silva (2010), também em período de águas altas. Os resultados obtidos para o igarapé do Quarenta e para o rio Negro, no município de Manaus, no período de águas baixas e águas altas, pela técnica dos tubos múltiplos encontram-se na figuras 1 e pela técnica da membrana filtrante, na figura 2, respectivamente.



**Figura 1:** Número mais Provável (NMP) de coliformes fecais e totais/100ml segundo a técnica dos "tubos múltiplos" nos sítios amostrais CEASA (rio Negro) e SEDUC (igarapé do Quarenta) nos períodos de águas baixas (A) e altas (B).

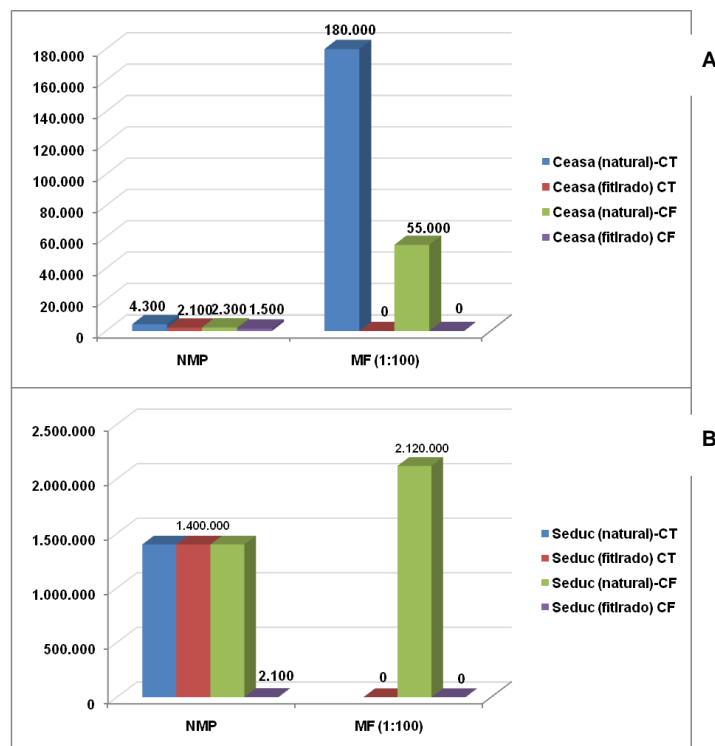


**Figura 2:** Número de colônias/100ml obtidos pelas técnicas da membrana filtrante nos sítios amostrais Ceasa (rio Negro) e Seduc (igarapé do Quarenta) nos períodos de águas baixas (A) e altas (B). Coliformes totais no sítio amostral SEDUC impossível de determinar.

Todas as amostras do igarapé do Quarenta apresentaram valores de coliformes fecais superior ao limite do método dos "tubos múltiplos" (1.400.000); resultado semelhante ao registrado por Cabral & Cunha (2004) nesse mesmo igarapé, próximo ao Conjunto Nova República. Na metodologia da membrana filtrante não foi possível identificar e, principalmente, quantificar as colônias típicas de coliformes totais nas amostras do igarapé do Quarenta, devido à sobreposição das colônias bacterianas em geral, somada a grande quantidade de partículas do material em suspensão na água do local (razão pela qual esse item não consta nos gráficos das figuras 2 e 3).

Apesar da divulgada transparência da água do rio Negro (Santos et al., 1984; Sioli, 1984), para determinação do número de colônias foi necessário diluir a amostra do rio Negro; enquanto no método do número mais provável o procedimento pode ser executado com água em estado natural. Em relação à concentração desses microrganismos, segundo ambas as metodologias, o rio Negro apresentou maior concentração de bactérias do grupo coliformes no período de águas baixas; semelhante ao observado por Melo et al. (2006), que encontraram maior concentração desses organismos na amostra referente a meados de fevereiro do que na de final de maio, mas diferente do observado por Oliveira et al. (2006), que observou o aumento da concentração de coliformes totais e fecais no Porto Ceasa no mês em que o nível do rio estava mais elevado.

Os resultados obtidos a água desses dois sítios amostrais, antes e depois de passarem pelo sistema de filtração, encontram-se na figura 3.



**Figura 3:** Número mais Provável e Número de Colônias/100ml de coliformes totais e fecais pelas técnicas da membrana filtrante em condições naturais e após passagem pelo sistema de filtração nos sítios amostrais Ceasa (A) e Seduc (B).

Não foi observado crescimento de bactérias do grupo coliformes pela técnica da membrana filtrante, entretanto apareceu um biofilme em sua superfície, provavelmente relacionado com o material em suspensão presente no local. Pela técnica dos "tubos múltiplos" houve redução da quantidade de coliformes totais e fecais, mas não a eliminação total desses microrganismos em ambas as amostras.

#### 4. Conclusão

Os resultados realizados neste projeto comprovaram que para águas sob forte influência antrópica o método de membrana filtrante não é aconselhável, devido, principalmente, à grande concentração de resíduos orgânicos, o que dificulta a passagem do filtro e compromete a leitura e contagem das colônias. Por mais que o método do número mais provável ("tubos múltiplos") demande um longo período de tempo para chegar ao resultado final e seja mais trabalhoso, ele apresentou maior eficiência para esses tipos de águas contaminadas. Segundo ambos os métodos, no rio Negro houve maior concentração de ambos os grupos de coliformes no período de águas baixas; entretanto para o Igarapé do Quarenta os resultados foram divergentes, considerando a limitação de ambas as metodologias, novos testes devem ser utilizados para verificar a melhor diluição para suas águas e a confiabilidade dos resultados obtidos. Quanto ao sistema de filtração da CPPF, o mesmo, a princípio, apresentou-se eficaz na eliminação de coliformes totais e fecais, segundo os resultados obtidos pela técnica da membrana filtrante, mas eficácia relativa (redução na concentração, mas não eliminação total) pelos "tubos múltiplos". Novos estudos fazem-se necessários para verificar a possível influência do biofilme formado na determinação pelo método da membrana filtrante sobre os resultados obtidos.

#### 5. Referências

American Public Health Association –APHA; American Water Work Association – AWWA; Water Pollution Control Federation - WPCF. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, American Public Health Association, 21a edição. CD-rom.

Cabral, F.N. Cunha, H.B.;2004. Avaliação das variáveis químicas e da colimetria, em igarapés das bacias hidrográficas de Educandos, São Raimundo e Tarumã. In: XIII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA. *Anais*. Manaus: INPA, pp. 288- 289.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Normas Técnicas CETESB. 1990. *Norma L5.230 – NOV/1990 - Escherichia coli* – Determinação pela técnica de membrana filtrante em amostras de água (método de ensaio). São Paulo: CETESB, 25p.

CETESB. *Norma L5.214, AGO 2007 - Coliformes totais* – determinação pela técnica de membrana filtrante (método de ensaio). São Paulo: CETESB, 30p.

Hachich, E.M. (Coord.). 2008. Análises microbiológicas da água. Vol. 1. São Paulo: CETESB. 131 p.

Melo, A.; Cunha, H.B.; Baraúna, E.F. 2006. Avaliação dos coliformes nas águas do rio Negro na orla de Manaus-AM. In: XV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA. *Anais*. Manaus: INPA, pp. 373-374.

Oliveira, J.M.; Cunha, H.B.; Baraúna, E.F. 2006. Avaliação dos coliformes nas águas do rio Negro na orla de Manaus/AM. In: XVI Jornada de Iniciação Científica do PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA. *Anais*. Manaus: INPA, pp. 461-462.

Pascoaloto, D.; Bringel, S.R.B.; Silva, M.L.. 2009. Comunidades de algas e qualidade da água na orla de São Gabriel da Cachoeira. In: Cd do II Workshop do projeto Fronteira. INPA, Manaus-AM.

Santos, U.M.; Bringel, S.R.B.; Bergamin Filho, H.; Ribeiro, N. M. G.; Bananeira, M.. Rios da Bacia Amazônica I. Afluentes do rio Negro. *Acta Amazonica*, v. 141-2, p. 222-237, 1984.

Silva, M.L. (2010). *Qualidade das águas de sub-superfície utilizadas para consumo humano em cidades na calha do rio Negro – Amazonas*. Relatório Final de Projeto (Modalidade PIPT), Manaus, FAPEAM, 87 p.

Sioli, H. 1984. Introduction: history of Discovery of the Amazon and the research of Amazonian waters and landscapes. In: Sioli, H., *Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and it´s basin*. The Hague, Dr. W. Junk. p. 1-13.