



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA

TALITA ROCHA DE MIRANDA PINTO

EQUIVALÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE A TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM  
TUBOS MÚLTIPLOS E O SISTEMA CROMOGÊNICO COLILERT® NA  
IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

FORTALEZA  
2012

TALITA ROCHA DE MIRANDA PINTO

EQUIVALÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE A TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM  
TUBOS MÚLTIPLOS E O SISTEMA CROMOGÊNICO COLILERT® NA  
IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Monografia apresentada ao Curso  
Farmácia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Farmacêutica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Maria  
Barros Souza

FORTALEZA  
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

P732e Pinto, Talita Rocha de Miranda

Equivalência de resposta entre a técnica de fermentação em tubos múltiplos e o sistema cromogênico colilert® na identificação de coliformes totais e termotolerantes/ Talita Rocha de Miranda Pinto. - 2012.

62 f. : il.

Trabalho de Conclusão e Curso (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Maria Barros Souza

1. Água 2. Coliformes totais 3. Coliformes termotolerantes 4. Técnica de fermentação em tubos múltiplos 5. Colilert® 6. Equivalência. I. Título.

---

CDD 615.1

TALITA ROCHA DE MIRANDA PINTO

EQUIVALÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE A TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM  
TUBOS MÚLTIPLOS E O SISTEMA CROMOGÊNICO COLILERT® NA  
IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Monografia apresentada ao Curso  
Farmácia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Farmacêutica.

Aprovada em: 14 / 06 / 2012.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Maria Barros Souza (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Rafaela Gomes Bezerra (Farmacêutica)  
Farmácia Escola (UFC)

A **DEUS**, que por pura misericórdia me manteve sempre a sua distância apenas por uma oração, oferecendo-me consolo indescritível nos momentos de dificuldade, e aos meus pais

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tito e Fátima, pelo amor, carinho, compreensão e incondicional dedicação a nossa família. Pelo exemplo de dignidade e honestidade que formam o meu alicerce, a minha mais profunda gratidão.

Aos meus queridos irmãos, Tito e Lívia, por serem tão especiais e me proporcionarem força e apoio sempre. Pelos sublimes momentos com eles compartilhados, o meu orgulhoso agradecimento.

A toda minha família, pela peculiaridade com que ama, educa e faz cobranças mantendo-se sempre unida em quaisquer situações e por compreender meus momentos de ausência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de infância, Laís, Yuri, Tibério e Iury, pelo carinho oferecido durante todos esses anos.

Às minhas amigas, Brená, Cláudia, Hellen, Santelma, Sibelle, Yara, pela amizade, carinho, compreensão, ensinamentos madrugadas a fora, dúvidas tiradas, alegrias e tristezas compartilhadas. Sem vocês a minha formação acadêmica não teria sido tão especial.

Aos demais colegas de curso, por terem percorrido comigo essa longa estrada em busca do conhecimento de Farmácia, estando sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

A todos os meus professores que, com toda dedicação, me proporcionaram uma enorme fonte de conhecimento servindo de inspiração para o desenvolvimento da minha carreira profissional.

À Rafinha e à Salete que, além de muito conhecimento prático, me ofereceram carinho, atenção e foram muito prestativas. Sem elas o trabalho teria sido bem mais difícil e desgastante. Muito obrigada, meninas.

À Farmácia Escola e ao CEDEFAR, pela concessão do espaço e de materiais para realização das análises.

Ao professor Everardo e à, Rafinha por terem aceitado, com muita simpatia, participar da banca de defesa desta monografia.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento dessa monografia, compartilhando comigo as alegrias e os desafios desta etapa da minha vida, agradeço com muito carinho.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha querida orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Maria Barros Souza, pela orientação, carinho e incentivo desde os primeiros meses da minha vida acadêmica, o meu respeitoso agradecimento.

“Não se pode ensinar tudo a alguém,  
pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por  
si mesmo.“

(Galileu Galilei)

## RESUMO

A água está associada a grandes riscos à saúde pública, uma vez que pode ser um importante veículo de transmissão de doenças de natureza infecciosa e, por isso, a avaliação da sua qualidade microbiológica através da identificação de indicadores biológicos de contaminação, como os coliformes, representa a possibilidade de diminuição de inúmeros surtos de doenças. Existem diversos métodos, tais como a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (método convencional) e o Sistema Enzimático Cromogênico Colilert® (método rápido), que podem ser empregados com essa finalidade, sendo capazes de determinar tanto coliformes totais como termotolerantes, cujo principal representante é a *Escherichia coli*. A fim de verificar a equivalência entre eles, amostras de água da Lagoa do Porangabuçu foram analisadas por meio de diluições seriadas, mostrando que ambas as metodologias foram capazes de detectar coliformes totais e termotolerantes de forma equivalente. No entanto, tal equivalência não foi observada na quantificação, uma vez que o método rápido apresentou maiores contagens, indicando, portanto, maior capacidade de enumeração de coliformes quando aplicada a metodologia de diluições seriadas.

**Palavras-chave:** Água. Coliformes totais. Coliformes termotolerantes. Técnica de fermentação em tubos múltiplos. Colilert®. Equivalência.

## ABSTRACT

The water is associated with major public health risks since it may be an important vehicle for infectious diseases transmission and, therefore, the assessment of its microbiological quality through the biological indicators of contamination such as the coliform represents the possibility of reducing the number of disease outbreaks. There are several methods such as the Multiple Tubes Fermentation technique (conventional method) and the Colilert® Chromogenic Enzyme System (quick method) which can be used for this purpose, thus being able to determine both total and thermotolerant coliforms like the *Escherichia coli*. In order to verify the equivalence between them, water samples from the Porangabuçu Lagoon were analyzed by successive dilutions, showing that both methodologies were able to detect total and thermotolerant coliforms equivalently. This, however, was not observed on the quantification, since the quick method showed higher counts and indicated a greater capacity of coliforms enumeration when applied the successive dilutions methodology.

**Keywords:** Water. Total coliforms. Thermotolerant coliforms. Multiple Tubes Fermentation Technique. Colilert®. Equivalence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quanti-Tray® (Idexx) (A) ilustrando a coloração amarela resultante da degradação do ONPG e Quanti-Tray®/2000(Idexx) (B) ilustrando a degradação do ONPG (coloração amarela) e do MUG (fluorescência).....	31
Figura 2 - Sequência de preparação das diluições da amostra utilizadas nos dois métodos.....	35
Figura 3 - Preparação e padronização do microrganismo teste.....	36
Figura 4 - Sequência de análise para identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes pela Técnica em Tubos Múltiplos.....	38
Figura 5 - Tubos contendo caldo Bile Verde Brilhante e o tubo de Durhan apresentando turvação e produção de gás.....	39
Figura 6 - Tubos contendo caldo EC e o tubo de Durhan apresentando turvação e produção de gás.....	39
Figura 7 - Placas contendo meio EMB com colônias nucleadas com brilho verde metálico características de <i>E.coli</i> .....	40
Figura 8 - Sequência de análise para identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes/ <i>E.coli</i> pela do Substrato Definido Colilert®.....	41
Figura 9 - Tubos contendo Colilert® apresentando positividade para coliformes totais (coloração amarela) e positividade para coliformes termotolerantes/ <i>E.coli</i> (fluorescência).....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das amostras de água da Lagoa do Porangabuçu para coliformes totais e termotolerantes pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM).....	43
Tabela 2 - Resultados das amostras coletadas na Lagoa do Porangabuçu para coliformes totais e termotolerantes através do Sistema Cromogênico Colilert®.....	44
Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de coliformes totais.....	46
Tabela 4 - Comparação dos resultados obtidos pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de coliformes termotolerantes.....	47
Tabela 5 - Resultados da enumeração de coliformes totais e termotolerantes pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e pelo Sistema Colilert® em amostras de água da Lagoa (NMP/100 mL)....	49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância da qualidade da água para a saúde pública.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Contaminação da água.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Microrganismos indicadores.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Grupo dos coliformes totais.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Grupo dos coliformes termotolerantes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b><i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>2.7</b>	<b>Métodos utilizados na determinação de coliformes totais, termotolerantes e <i>E.coli</i> em água.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7.1</b>	<b><i>Métodos convencionais.....</i></b>	<b>26</b>
2.7.1.1	<i>Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM).....</i>	27
2.7.1.2	<i>Técnica da Membrana Filtrante.....</i>	28
2.7.2	<i>Métodos Rápidos.....</i>	29
2.7.2.1	<i>Colilert® (INDEXX).....</i>	31
2.7.2.2	<i>Colitag™ (HEXIS).....</i>	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Amostragem.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Coleta.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparação das amostras.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises Microbiológicas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Preparação e padronização do microrganismo teste.....</i></b>	<b>36</b>
<b>4.4.2</b>	<b><i>Preparação dos controles positivos e negativos.....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.4.3</b>	<b><i>Identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes.....</i></b>	<b>37</b>
4.4.3.1	<i>Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM).....</i>	37
4.4.3.2	<i>Técnica do Substrato Cromogênico Definido Colilert® (Idexx).....</i>	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>

<b>5.1</b>	<b>Identificação de Coliformes Totais e Termotolerantes.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Comparação entre a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de Coliformes Totais e Termotolerantes.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>Quantificação de Coliformes Totais e Termotolerantes.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água é considerada um dos elementos indispensáveis à vida, sendo uma das principais substâncias ingeridas pelo ser humano. Como um grande recurso natural, a água é de extrema importância na manutenção da biodiversidade do planeta, sendo caracterizada como um recurso estratégico da humanidade de grande relevância ecológica, econômica e social.

Sua importância não está limitada apenas ao seu consumo direto, abrangendo também diversas atividades antrópicas como produção de alimentos, de energia, de bens de consumo, de transporte e de lazer, bem como a manutenção e o equilíbrio ambiental dos ecossistemas terrestres (LIMA, 2001).

Por outro lado, ela está associada a grandes riscos à saúde pública, uma vez que pode ser um importante veículo de transmissão de doenças de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica (ISAAC-MARQUEZ *et al.*, 1994; MACEDO, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% das doenças relatadas em países em desenvolvimento tem como veículo de transmissão a água de má qualidade, muitas vezes, contaminada por microrganismos patogênicos (MACEDO, 2007).

Estes microrganismos podem ser encontrados em quase todos os ambientes aquáticos, desde pequenos riachos até grandes oceanos, uma vez que estes oferecem uma grande variedade de habitação e nichos ecológicos (MENDONÇA-HAGLER; HAGLER, 1991).

O Ministério da Saúde, através da Portaria n.º 2.914 de 12 de dezembro de 2011, define água potável como aquela própria ao consumo humano que atenda ao padrão de potabilidade, ou seja, que apresente padrões físicos, químicos, microbiológicos e/ ou radioativos em conformidade com o conjunto de valores permitidos como parâmetro da qualidade da água para consumo humano, não oferecendo riscos à saúde (BRASIL, 2011).

A avaliação da qualidade microbiológica da água destinada ao consumo humano através da pesquisa de agentes contaminantes, principalmente os de origem entérica, representa a possibilidade de diminuição de inúmeros surtos de doenças (GIOMBELLI; RECH; TORRES, 1998).

O estudo de métodos de avaliação da qualidade da água está diretamente relacionado com a proteção à saúde pública, e os critérios adotados para assegurar essa qualidade têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que, se propriamente implantadas junto à população, garantirão a segurança do fornecimento de água através da eliminação ou redução, à concentração mínima, de constituintes na água, conhecidos por serem perigosos à saúde (D'AGUILA et al., 2000).

Existem diversas técnicas de análise microbiológica empregadas no controle de qualidade da água, sendo os níveis de contaminantes toleráveis e padrões de qualidade, pré-estabelecidos de acordo com o seu destino (MACEDO, 2007).

Diante das dificuldades para identificação de todos os microrganismos patogênicos que possam estar presentes na água, empregam-se as técnicas que permitam a identificação de indicadores biológicos de contaminação da água, como os coliformes, cuja presença indica a possível existência de patógenos tais como *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio cholerae* e *Shigella sp*, além de vírus (hepatite, poliomielite e gastroenterites) e protozoários como *Entamoeba sp* e *Giardia sp* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O grupo dos coliformes está dividido em dois grandes grupos, a saber, grupo dos coliformes totais e grupo dos coliformes fecais (termotolerantes), cuja principal representante é a bactéria *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal.

Para que se possa detectar e/ou determinar a quantidade de coliformes em água, dispõe-se de basicamente três técnicas. É a variação na escolha dos meios de cultura que seleciona a microbiota alvo.

A Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e a Técnica da Membrana Filtrante são os métodos tradicionais mais frequentemente utilizados para enumeração de coliformes, enquanto o Teste de presença/ausência (P/A) é uma simplificação da técnica dos tubos múltiplos que não objetiva a quantificação de coliformes nas amostras, mas sim a verificação da presença em um determinado volume (SILVA et al., 2005).

Por empregar grande quantidade de meios de cultura, envolver repiques para promoção do crescimento de bactérias, necessitar de diferentes tipos de vidrarias, demandar longos períodos de incubação além de exigir posterior

confirmação dos coliformes totais, fecais e *E.coli*, a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos é considerada muito trabalhosa.

Esta técnica é baseada no princípio de separação, por agitação, de bactérias presentes em uma amostra líquida, resultando em uma suspensão onde as células estejam uniformemente distribuídas. A combinação de tubos com crescimento positivo ou negativo após a incubação permite estimar, por cálculos de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra. Já o Teste de presença/ausência é um pouco mais simples, requer apenas um frasco de cultura para todo o volume a ser analisado (SILVA *et al.*, 2005).

O uso da Técnica da Membrana Filtrante permite determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) dos microrganismos alvo presentes na amostra. Essa técnica baseia-se na filtração de um determinado volume através de uma membrana com um poro de 0,45µm. As bactérias que apresentam uma dimensão maior que a dos poros da membrana ficam retidas na mesma, sendo então transferidas pra uma placa de Petri contendo meio de cultura seletivo e diferencial que permita a visualização de colônias típicas. O resultado é expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/100 mL), não sendo indicado para águas com turbidez elevada uma vez que dificulta o processo de filtração (SILVA *et al.*, 2000).

Um grande número de técnicas diferentes, baseadas em substratos enzimáticos fluorogênicos e/ou cromogênicos, tem sido desenvolvidas e envolvem a capacidade de detectar a presença de enzimas específicas com o emprego de substratos apropriados (GREGHII, 2005).

A aplicação de sistemas enzimáticos cromogênicos como o Colilert® permite determinar simultaneamente coliformes totais e coliformes fecais presentes em amostras de água, utilizando apenas um meio de cultura, o que reduz o tempo de análise, aumentando a produtividade laboratorial. Além disso, os sistemas enzimáticos não necessitam de confirmação e ainda eliminam a interpretação subjetiva encontrada nos métodos tradicionais, por isso seu emprego está sendo cada vez mais disseminado.

O emprego de testes rápidos, entretanto, não exclui a aplicação do método convencional como alternativa no monitoramento da qualidade microbiológica da água. A análise bacteriológica de água realizada pelas diferentes técnicas deve responder de forma equivalente na determinação de coliformes,

garantindo segurança quanto aos resultados e a possibilidade de escolha na utilização das mesmas. Portanto, uma vez comprovada equivalência entre os métodos, cabe ao analista decidir qual o mais viável para execução da sua análise.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância da qualidade da água para a saúde pública

Aproximadamente dois terços da superfície do nosso planeta é constituída por água, destes dois terços, 97,5% está presente nos mares e oceanos, 2,493% fica armazenada nas geleiras, e o restante, apenas 0,007%, está disponível para uso, podendo ser encontrada em lençóis subterrâneos, lagos, rios e na atmosfera (UNIAGUA, 2012).

Dentre todas as substâncias ingeridas pelo homem, a água é a que aparece em maior quantidade, sendo também a principal substância por ele excretada. Diariamente, o homem chega ingerir cerca de 2 litros de água, isso representa cerca de 3% do seu peso corpóreo (RIEDEL, 1992 *apud* MARQUEZI 2010).

A presença de água no corpo humano é ainda essencial para o funcionamento das atividades celulares e orgânicas sendo de fundamental importância na realização das suas atividades habituais (VASCONCELOS; AQUINO, 1995).

Indispensável para a vida, a água é também elemento insubstituível para diversos segmentos industriais, seja como integrante de produtos elaborados, utilizada na limpeza de matérias-primas e instalações ou na geração de energia, como o vapor, entre outros (DAVID *et al.*, 1999).

Por se tratar de um recurso renovável que está presente em grandes concentrações no planeta, a humanidade, com o passar do tempo, tem esquecido que a água é um recurso limitado e passou a tratá-la com bastante descaso, já que tanto a escassez d'água como seu excesso é resultante do uso indevido dos recursos naturais (CALIJURI; OLIVEIRA, 2000). Isso representa uma séria e crescente ameaça para o desenvolvimento sustentável e à proteção do meio ambiente (BLANCO-HERNANDÉZ *et al.*, 1998 *apud* JULIÃO, 2003).

No Brasil, apesar deste recurso ser considerado abundante, existe lugares muito carentes onde a água acaba se tornando limitada às necessidades do homem. Isso acontece principalmente em locais onde o desenvolvimento ocorreu de forma desordenada provocando a deterioração das águas disponíveis, seja devido

ao lançamento indiscriminado de esgotos domésticos, despejos industriais e agrotóxicos ou por outros poluentes (MOITA; CUDO, 1991).

Grande parte das exigências do mundo moderno é provida por água de mananciais subterrâneos ou de superfície. Por mais abundante que seja a água é insuficiente para atender a um fenômeno de demanda infinita, principalmente diante do desperdício e da poluição incontrolada dos mananciais (SILVA; SALGUEIRO, 2001; JULIÃO, 2003).

A água está se tornando, cada vez, mais um bem escasso e sua qualidade tem se deteriorado rapidamente apesar de todos os esforços para armazenar e diminuir o seu consumo (VASCONCELOS; AQUINO, 1995).

Segundo relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), medidas urgentes devem ser tomadas para praticar o uso racional dos recursos hídricos, ou 60 países, que correspondem a 75% da população mundial, deverão sofrer com a falta de água no ano de 2050 (RODRIGUES; MALAFAIA, 2009).

Além de ser um bem econômico, a água subterrânea é considerada, mundialmente, uma fonte substancial de abastecimento para o consumo humano, principalmente por populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento (GREGHI, 2005).

Outra parcela da população, que considera as águas subterrâneas uma fonte de abastecimento, são aqueles indivíduos que têm acesso, porém não apresentam o fornecimento regular. As fontes de contaminação dessas águas normalmente estão associadas não só a despejos domésticos ou industriais, mas também ao chorume proveniente de aterros de resíduos sólidos que, quando dispostos de forma inadequada, podem poluir e contaminar os lençóis freáticos com microrganismos patogênicos (FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001).

A interferência do homem seja ela de forma concentrada, gerando esses despejos, ou de forma dispersa, pela aplicação de defensivos agrícolas no solo, contribui diretamente para introdução de compostos na água que acabam afetando sua qualidade. Logo, o modo de uso e ocupação do solo pelo homem está intrinsecamente relacionado à qualidade da água (SPERLING, 2005).

Em âmbito nacional, o que se observa é um elevado crescimento populacional, principalmente nas áreas urbanas, o que caracteriza, consequentemente, um aumento da produção de resíduos, sejam eles sólidos, líquidos ou gasosos que acaba dificultando a recuperação de ecossistemas

comprometendo assim a oferta de água com qualidade que possa suprir as necessidades individuais (MOTA, 1997 *apud* PAIVA; SALGUEIRO, 2002).

Os parâmetros básicos de qualidade da água (pH, cor, turbidez, níveis de cloro, flúor ou coliformes) apresentam estreita relação com a qualidade de vida da comunidade. Portanto, os serviços de saneamento e distribuição de água desempenham um papel fundamental na garantia das condições de saúde e bem-estar da população. Países que têm um maior acesso da população a esses serviços básicos apresentam uma menor taxa de mortalidade infantil (OPAS, 2007).

Em virtude das precárias condições de saneamento e da má qualidade das águas, o que têm se observado em diversos países em desenvolvimento é o crescimento, cada vez mais acelerado, de doenças diarreicas de veiculação hídrica, tais como, febre tifoide, cólera, salmonelose, shigelose, outras gastroenterites como poliomielite e hepatite A, além das verminoses amebíase e giardíase. Esse crescimento acelerado tem sido responsável por vários surtos epidêmicos bem como pelas elevadas taxas de mortalidade infantil relacionada à água de consumo humano (LESER *et al.*, 1985).

Os microrganismos patogênicos responsáveis pela transmissão dessas doenças de veiculação hídrica são, principalmente, de origem entérica, animal ou humana. Eles são normalmente transmitidos pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água poluída com fezes (GRABOW, 1996 *apud* AMARAL, 2003).

Outro fator que tem conduzido a efeitos nocivos à saúde são os despejos industriais que compreendem desde matéria em suspensão e metais pesados, até cloro procedente da dispersão de sais nas ruas em determinadas épocas. Esses efeitos maléficos podem causar tanto as comuns dores de cabeça, náuseas, irritações na pele e pulmões, como também sérias reduções das funções neurológicas e hepáticas (MORAES; JORDÃO, 2002).

Existem ainda evidências do aumento na incidência de carcinomas gastrointestinais e de bexiga, anomalias reprodutivas e malformações congênitas, que caracterizam efeitos genotóxicos à saúde, em populações que vivem próximo a perigosos depósitos de despejo (HOUK, 1992 *apud* AMARAL, 2003).

Pode-se observar atualmente em países de terceiro mundo é que, devido aos grandes problemas econômicos e estruturais por eles enfrentados, é crescente

o número de cidades que apresenta quadros preocupantes quanto à infraestrutura de saneamento básico, problema esse que, se considerado prioritário, poderia prevenir a ocorrência de muitas doenças (DAVID *et al.*, 1999).

O controle da qualidade da água faz parte das ações da vigilância sanitária que são de extrema importância e auxiliam quanto à necessidade, qualidade e promoção de medidas de intervenção, sejam elas preventivas ou corretivas, que garantam água de boa qualidade para o consumo (TEIXEIRA, 2005).

Essas medidas podem evitar problemas relacionados à falta de saneamento básico que resultam no aumento do número de casos de doenças parasitárias e infecciosas, e consequentemente elevam os gastos com a Saúde Pública (D'AGUILA *et al.*, 2000).

Nesse contexto, questões relativas ao saneamento do meio são de fundamental importância para Saúde Pública; a universalização e melhoria da qualidade dos serviços de saúde implica, entre outras coisas, na redistribuição de renda e elevação dos padrões de conforto da população, compondo um novo ciclo de desenvolvimento do saneamento ambiental, como parte integrante de uma estratégia para a melhoria da qualidade de vida abrangendo, também, os aglomerados urbanos (JULIÃO, 2003, p. 8).

## 2.2 Contaminação da água

Por ser considerada componente essencial para a manutenção da vida na terra, a água deve ser preservada, mas nem sempre isso ocorre. A contaminação da água pode impedir a sobrevivência da vida vegetal e animal, causando ainda graves consequências aos seres humanos (CARMOUZE, 1994).

Registros do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que cerca de 80% das internações hospitalares do Brasil se devem a doenças de veiculação hídrica por conta da sua má qualidade (MERTEN; MINELLA, 2002).

A poluição da água pode ter origem química, física ou biológica. Em geral, a adição de um tipo destes poluentes altera também as outras características da água indicando que, de alguma maneira, seu uso foi prejudicado o que pode atingir o homem diretamente, seja através da ingestão, do banho ou do uso para lavar roupas e utensílios como, principalmente, através da alimentação (PEREIRA, 2004; GREGHI, 2005).

São importantes fontes de contaminação dos recursos hídricos os esgotos sem tratamento que são lançados em rios e lagos, que, além disso, também são atingidos por defensivos agrícolas que escoam com as águas das chuvas; os

aterros sanitários, que afetam os lençóis freáticos, e os garimpos e indústrias que acabam lançando seus resíduos e produtos químicos, em geral muito tóxicos, em rios, lagos e córregos, muitas vezes, sem antes passar por nenhum tratamento (MARQUEZI, 2010).

O que se tem observado é que a qualidade da água tem sido comprometida desde o manancial, pelo lançamento de efluentes e resíduos, o que acaba exigindo maior investimento nas plantas de tratamento e mudanças na dosagem de produtos utilizados no tratamento da água para se garantir que, ao sair das estações, ela permaneça com qualidade até o momento do uso pela população (BRASIL, 2004).

Os efluentes domésticos são considerados a principal fonte de poluição comprometedora da qualidade da água para fins de abastecimento. Eles são constituídos basicamente por contaminantes orgânicos, nutrientes e microrganismos, que podem ser patogênicos, sendo derivados do nosso esgoto e do lixo produzidos diariamente. Além dos efluentes domésticos, os efluentes industriais e o deflúvio superficial urbano e agrícola também são grandes responsáveis pela poluição das águas (SÁ, 2006).

Dentre as impurezas que podem estar presentes na água, algumas podem ser inócuas. Aquelas que são ditas prejudiciais incluem os vírus, bactérias, parasitas, substâncias tóxicas e elementos radioativos (RICHTER; AZEVEDO NETTO, 1995).

No meio rural, o risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica é muito mais alto quando comparado ao meio urbano, isto se deve principalmente à possibilidade de contaminação bacteriana de águas, pois estas, muitas vezes, são captadas em poços muito antigos, que não foram vedados de maneira adequada e situam-se próximos a fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (STUKEL *et al.*, 1990).

Embora em menor escala, a população urbana também é afetada pela contaminação das águas. O que se pode inferir é que o crescimento da população, bem como das atividades econômicas por ela desenvolvidas, aumenta ainda mais a quantidade de impurezas nas águas, o que acaba tornando qualquer fonte de água superficial insegura para consumo direto, gerando então a necessidade de um tratamento prévio da mesma antes do consumo (SANTOS, 2007).

As fontes de água devem ser protegidas de dejetos humanos ou de animais, que podem conter uma grande variedade de bactérias, vírus, protozoários e helmintos, que podem ser patogênicos ao homem. Falhas na proteção das fontes e no tratamento da água podem expor a população a riscos de desenvolverem doenças intestinais ou infecciosas. Os grupos de risco para estas doenças são principalmente crianças, idosos, pessoas com a saúde debilitada ou que vivem em condições de saneamento precário. Para essas pessoas a dose infectiva é menor que para o resto da população (MARQUEZI, 2010, p. 30).

De maneira geral, as doenças relacionadas com a água recebem duas classificações distintas: doenças de transmissão hídrica e doenças de origem hídrica. Nas doenças de transmissão hídrica, a água funciona como veículo do agente infeccioso e a causa das doenças geralmente está relacionada à presença de microrganismos patogênicos nas fezes humanas e de animais que contaminam a água ao entrar em contato com ela. Essas doenças geralmente resultam em problemas no trato gastrintestinal (VERTONI; GALLO, 1994).

A contaminação microbiológica das águas de consumo humano resulta em um grande número de enfermidades que causam um grande impacto na população. Porém, o que se observa é que somente 19% dos Estados realizam avaliações sistemáticas da qualidade da água visando à redução da morbimortalidade das doenças de veiculação hídrica (BARRETO, 2009).

As doenças de origem hídrica, por sua vez, são normalmente causadas pela presença, em concentrações inadequadas, de substâncias químicas, sejam elas orgânicas ou inorgânicas, que podem ser oriundas do próprio manancial ou serem resultantes da poluição. Alguns exemplos dessas doenças são o saturnismo, relacionada ao excesso de chumbo na água, e a meta- hemoglobinemia, ligada a presença em altas concentrações de nitrato na mesma (VERTONI; GALLO, 1994).

Em condições normais, os rios possuem diversos tipos de bactérias que compõem sua microbiota natural e são de grande importância uma vez que consomem matérias orgânicas e absorvem a carga poluidora que é lançada, sendo as principais responsáveis pela autodepuração, ou seja, a limpeza do rio. Ao receberem esgotos, esses rios passam a conter outros tipos de bactérias que podem prejudicar seriamente a saúde da população que utiliza essa água para seu consumo diário. Essas bactérias são representadas pelo grupo dos coliformes (GREGHI, 2005; MARTINS, 2006).

Esse grupo de coliformes também pode ser encontrado no solo e em vegetais. Algumas bactérias que o compõem apresentam a capacidade de se

desenvolver em águas que apresentem grandes quantidades de nutrientes, sendo chamadas genericamente de coliformes totais e outras, além não terem facilidade de se desenvolver em ambiente externo, apresentam pouca resistência à água e são comprovadamente de origem fecal e por isso foram durante muito tempo denominadas coliformes fecais, recebendo hoje a denominação de coliformes termotolerantes. Sua presença na água indica que patógenos como a *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae* e *Shigella* sp., além de vírus causadores de hepatite, poliomielite e gastroenterites, e protozoários como *Entamoeba* sp e *Giardia* sp podem estar presente na água (PELCZAR et al., 1997).

A presença dessas bactérias na água indica que a mesma recebeu matérias fecais ou de esgotos e, portanto pode estar sendo contaminada por microrganismos patogênicos carreados por fezes de indivíduos doentes logo, o controle das doenças veiculadas pela água se baseia na interrupção do ciclo: fezes humanas ou de animais → suprimento de água → consumo por humanos (GREGHI, 2005; MARQUEZI, 2010).

### 2.3 Microrganismos indicadores

Há muito tempo a utilização de microrganismos indicadores tem contribuído para avaliação da qualidade microbiológica da água, uma vez que, quando encontrados na água, eles podem ser associados à ocorrência de contaminação de origem fecal e, consequentemente, à possível presença microrganismos patogênicos intestinais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os microrganismos indicadores podem ser utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de diferentes tipos de água, seja ela para consumo, resíduária ou destinada à recreação (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

Os critérios que são considerados para que um grupo de microrganismos seja utilizado como indicadores são: i) deve ser de rápida e fácil detecção; não deve estar presente como contaminante natural na água ou no alimento, pois assim sua detecção não indicará, necessariamente, a presença da matéria fecal ou de patógenos; ii) deve estar sempre presente quando o patógeno associado estiver; iii) seu número deve correlacionar-se com o do patógeno; iv) deve apresentar necessidades de crescimento e velocidade de crescimento semelhante às do patógeno; v) deve ter velocidade de morte que seja ao menos semelhante à do patógeno e, se possível, sobrevivência levemente superior à do patógeno (GREGHI, 2005, p. 28).

Por não existir nenhum microrganismo que atenda a todos esses critérios, alguns microrganismos como o *Streptococcus faecalis* ou *Enterococcus*, *Clostridium*

*perfringens*, vírus entéricos, coliformes e *Escherichia coli* (*E.coli*), que são carreados juntamente com dejetos humanos para o meio ambiente, são utilizados como indicadores alternativos de contaminação fecal (BURBARELLI, 2004).

Dentre esses microrganismos, os *Enterococcus* são bastante utilizados como indicadores alternativos, uma vez que a relação existente entre as contagens de coliformes fecais e *enterococcus fecalis* pode indicar se a contaminação recente é de origem humana ou animal (HAGLER; HAGLER, 1988). Contudo, os microrganismos mais utilizados como indicadores são os coliformes, uma vez que apresentam a vantagem de serem encontrados no intestino de animais de sangue quente sendo, ainda, eliminados em grandes quantidades nas fezes destes (cerca de  $3,0 \times 10^8$  UFC/g). Além disso, sua presença na água indica contaminação recente por material fecal e sua quantificação é bastante simples (HUNT; RICE, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

## **2.4 Grupo dos coliformes totais**

Esse grupo pode ser definido como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram negativas, não esporogênicas, em forma de bastonetes, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com formação de gás, ácido e aldeído, em 24-48 h, a uma temperatura de  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , podendo ainda apresentar atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (BRASIL, 2004).

O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais se encontram tanto bactérias originadas do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, mas com capacidade de se multiplicarem em água poluída, como *Serratia* e *Aeromonas*, motivo pelo qual sua quantificação não é tão representativa, como indicação de contaminação fecal, quanto à quantificação de *E.coli* (SILVA *et al.*, 2005).

## **2.5 Grupo dos coliformes termotolerantes**

As bactérias deste grupo se diferenciam do grupo de coliformes totais pelo fato de continuarem a fermentar a lactose com produção gás quando submetidas à temperatura de 44,5 a 45,5 $^{\circ}\text{C}$ . São utilizadas na identificação de

contaminação de origem fecal. Sob tais condições, aproximadamente 90% das culturas de *Escherichia coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (SILVA *et al.*, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* apresentam cepas de bactérias que podem originar-se de águas enriquecidas organicamente como, por exemplo, de efluentes industriais ou de materiais vegetais e solo em decomposição justificando assim o uso, mais apropriado, do termo termotolerantes em vez de fecais na distinção dos grupos de coliformes (SILVA *et al.*, 2005; WHO, 1996).

Dentre essas bactérias, a *Escherichia coli* é a maior representante do grupo de coliformes termotolerantes, constituindo aproximadamente 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais, sendo a mais conhecida e mais facilmente diferenciada dos membros não fecais (SILVA *et al.*, 2005).

## 2.6 *Escherichia coli*

A primeira descrição da bactéria *Escherichia coli* data de 1885, foi Theodor von Escherich quem inicialmente a identificou como parte da microbiota intestinal dos animais. Antes considerada não patogênica, teve sua caracterização modificada após a associação de alguns de seus sorotipos a doenças em animais e seres humanos (FERREIRA; KÖBIL, 2000 *apud* FORTES, 2008).

A espécie *Escherichia coli* pertence ao gênero *Escherichia*, classificado dentro da família *Enterobacteriaceae* fazendo parte do grupo dos coliformes. Apresenta-se na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporulados, com tamanho entre 1,1 a 1,5  $\mu\text{m}$  por 2 - 6  $\mu\text{m}$ , com capacidade de fermentar glicose, lactose e manitol, com produção de ácido e gás, a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , em 24 a 48 horas. Produz indol a partir do triptofano, é oxidase negativa, catalase positiva, apresenta atividade das enzimas  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase, podendo ou não apresentar motilidade através de flagelo (SILVA *et al.*, 2005; FORTES, 2008; MARQUEZI, 2010; MORELLI, 2003).

Em 1892 foi proposto o uso da *E. coli* como indicador de contaminação fecal em água, uma vez que esta bactéria é encontrada no intestino humano e de animais de sangue quente (MARQUEZI, 2010).

Nas fezes humanas, de gatos e cachorros, sua concentração pode variar de  $10^6$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) / g, nas fezes de gado e galinha a concentração varia entre  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g enquanto que nas fezes de coelhos, roedores e macacos, a variação gira em torno de  $10^1$  a  $10^5$  UFC/ g (MORELLI, 2003).

Tanto o isolamento como a identificação dessa espécie em água é fácil, e podem ser feitos através de técnicas simples e rápidas. A *E.coli* apresenta um período de sobrevida semelhante ao dos patógenos mais comuns não sendo tão resistentes quanto os vírus intestinais (JAY, 2005).

## **2.7 Métodos utilizados na determinação de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* em água**

Para se determinar a sanidade da água, as metodologias escolhidas devem ser simples e rápidas na detecção de bactérias indicadoras de contaminação fecal (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

A escolha da metodologia analítica pode levar a uma análise investigativa da presença ou ausência de microrganismos, a uma quantificação dos microrganismos presentes na amostra, além de possibilitar a identificação e caracterização das diferentes espécies microbianas (GREGHI, 2005).

Os métodos utilizados são hoje divididos em convencionais, que foram desenvolvidos há muito tempo e geralmente são adotados como oficiais em diversos países, e em métodos rápidos, que começaram a ser desenvolvidos na década de 70 tendo seu uso cada vez mais disseminado por simplificarem o trabalho e reduzirem os custos das análises (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **2.7.1 Métodos convencionais**

Quando utilizados para caracterização de um determinado microrganismo, esses métodos são baseados na observação da capacidade do microrganismo de realizar determinadas reações bioquímicas que, geralmente, ocorrem em tubos de ensaio e demandam bastante tempo além de representarem um custo elevado (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Dentre esses métodos, estão a técnica de fermentação em tubos múltiplos e a técnica da membrana filtrante que, apesar de serem seletivos para determinação do grupo coliforme, não indicam uma separação específica das

diferentes espécies de origem fecal do grupo coliforme, necessitando ainda de testes confirmatórios (GREGHI, 2005; MARQUEZI, 2010).

Em relação ao monitoramento da qualidade da água, estes métodos são considerados demorados e, portanto, podem não impedir que a população faça uso da água antes da obtenção de resultados o que aumenta o risco de contrair doenças causadas pela água de má qualidade durante o monitoramento (HSIEH, 2008 *apud* MARQUEZI, 2010).

#### 2.7.1.1 Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM)

A técnica dos tubos múltiplos é um método de análise quantitativo que permite a determinação do Número Mais Provável (NMP) de microrganismos alvo na amostra, sendo por isso conhecida também por Método do Número mais Provável (SILVA *et al.*, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Nesta técnica, alíquotas e/ou diluições da amostra a ser analisada são distribuídas em uma série de tubos de ensaio contendo um meio de cultura diferencial para crescimento dos microrganismos alvo. Através de cálculos de probabilidade, a combinação de tubos positivos e negativos permite estimar a densidade real de microrganismos presentes na amostra. A quantidade de tubos de ensaio utilizada por série (3 ou 5) pode ser relacionada à precisão do método, e os resultados em NMP podem ser obtidos pela consulta a tabelas apropriadas (SILVA *et al.*, 2005; HUNT; RICE, 2005).

Além da análise de bactérias do grupo coliforme, a técnica de fermentação em tubos múltiplos também é indicada para determinação de outros microrganismos tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* e *Clostridium perfringens*. Como o meio de cultura é específico para cada tipo de microrganismo, é a seleção deste que determina o microrganismo a ser contado (SILVA *et al.*, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Quando se deseja realizar uma contagem presuntiva de coliformes através desta metodologia, normalmente utiliza-se o meio de cultura Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), que é um meio de enriquecimento seletivo para coliformes e apresenta a característica de recuperar células injuriadas. A positividade é indicada pelo crescimento (turvação) no meio, bem como pelo surgimento de gás (bolha) no interior do tubo de Durhan após o período de incubação (HAJDENWURCEL, 1998).

A confirmação da presença de coliformes totais segue a mesma metodologia, sendo que o meio indicado é o Caldo Verde Brilhante Bile (VB), que inibe o crescimento de microrganismos Gram-positivos por apresentar em sua composição sais biliares além da lactose, que serve de substrato para a produção de gás pelos coliformes (HAJDENWURCEL, 1998).

Já a confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita através da utilização do meio de cultura Caldo EC (*Escherichia coli*), neste caso a incubação deve ser feita em banho-maria a uma temperatura de 44,5°C com variação não superior a 0,2°C por 24± 2h. A não ocorrência de gás indica ausência de coliformes termotolerantes na amostra, uma vez que estes apresentam a característica de continuarem a fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas (SILVA *et al.*, 2005).

Se houver ainda o interesse de confirmar a presença/ausência de *E. coli* na amostra, pode-se realizar as provas bioquímicas tradicionais a partir da tomada de uma alçada do meio EC com produção de gás e posterior estriamento em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). O crescimento de colônias típicas de *E. coli*, ou seja, colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico após incubação a 35°C por 24h, deve ser isolado em tubos contendo Ágar Nutriente (AN) ou outro meio adequado para inoculo de provas bioquímicas e incubado sob as mesmas condições da placa. Esse isolamento proporciona a obtenção de colônias puras que serão utilizadas para a realização da coloração de Gram, prova de oxidase e provas bioquímicas, de indol, VM, VP e citrato (IMVC) (SILVA *et al.*, 2005).

#### 2.7.1.2 Técnica da Membrana Filtrante

Nesta técnica, volumes adequados de amostra são filtrados através de membranas que permitem a passagem de líquidos, mas retém microrganismos com dimensões superiores a seus poros. Após essa filtração, a membrana é transferida para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo e diferencial para o crescimento do microrganismo alvo e, após o período de incubação, as colônias são enumeradas (GRECHI, 2005).

A técnica não é restrita a análise de coliformes, podendo também ser aplicada na análise de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus*. Por ser uma metodologia de concentração de microrganismo, ela é recomendada para amostras onde se espera ausência ou contagens bem baixas do microrganismo alvo, sendo

sua principal aplicação, a análise de água destinada ao consumo humano (SILVA et al., 2005).

### **2.7.2 Métodos Rápidos**

A necessidade de obtenção de dados analíticos mais rapidamente, a simplificação do trabalho, bem como o aumento da produtividade laboratorial despertou o interesse pelo desenvolvimento dos métodos rápidos (FRANCO; LANDGRAF; 2008).

Os métodos rápidos são baseados na utilização de substratos definidos apropriados, cromogênicos ou fluorogênicos, para a detecção da atividade de determinadas enzimas específicas do microrganismo alvo, que são capazes de modificar esses substratos, levando a uma alteração na cor do meio, no caso dos cromogênicos, ou uma alteração na fluorescência do mesmo, no caso dos fluorogênicos (MANAFI; KNEIFEL; BASCOMB, 1991; ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

A incorporação desses substratos em um meio seletivo pode eliminar a necessidade de subcultivos e posteriores testes bioquímicos para identificação de certos microrganismos (LEITE; FRANCO, 2006).

Para garantir um melhor e mais seguro controle da qualidade da água foram desenvolvidos diversos meios de detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli*, já que este grupo de bactérias é o mais importante indicador de contaminação da água. Dentre esses meios destacam-se os métodos Colilert e Colitag (MANAFI, 2000).

O uso das Técnicas dos Substratos Definidos além de permitir a detecção simultânea de coliformes totais e *E.coli* com apenas um meio de cultura, diminui consideravelmente o tempo necessário para obtenção de resultados, que não necessitam de confirmação. Dependendo do produto comercial utilizado, esse tempo varia entre 18 a 28 horas, o que representa grande vantagem pela rapidez do resultado e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento público (GREGHI, 2005).

#### **2.7.2.1 Colilert® (IDEXX)**

A Técnica do Substrato Cromogênico Enzimático Colilert® (Idexx) é baseada na identificação e contagem de microrganismos pela análise de suas

enzimas constituíveis. Fundamentada em dois substratos definidos, o orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) e o 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronídeo (MUG), possibilita a detecção simultânea de bactérias do grupo coliforme e *E. coli* em amostras de água (MARQUEZI, 2010; SILVA et al., 2005).

Os coliformes totais apresentam uma enzima, a  $\beta$ -galactosidase, que é capaz de decompor o ONPG, um substrato incolor. Ao sofrer decomposição, este forma o orto-nitrofenol e o meio sofre uma alteração de cor tornando-se amarelo bem forte, o que evidencia presença de coliformes totais na amostra. Já a *E. coli* apresenta a enzima  $\beta$ -glucuronidase que decompõe o MUG resultando em um produto, o 4-metilumbeliferona, que apresenta fluorescência azul sob luz ultravioleta (360nm) evidenciando assim a presença de *E. coli* na amostra (OLSTADT et al., 2007; COVERT et al., 1989 ; SILVA et al., 2000).

Vale ressaltar que as bactérias que não pertencem ao grupo coliforme como, algumas espécies do gênero *Aeromonas* e *Pseudomonas*, que também produzem a enzima  $\beta$ -galactosidase são suprimidas, não produzindo assim resposta positiva no teste a não ser que se encontre em densidades superiores a  $10^4$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (JULIÃO, 2003).

Diante do referido, pode-se dizer que os possíveis resultados para análise são: a permanência do meio incolor que significa ausência de coliformes totais e *E. coli* na amostra; alteração da cor do meio para amarelo sem fluorescência sob luz UV que significa presença de coliformes totais e ausência de *E. coli* na amostra; alteração da cor do meio para amarelo com fluorescência quando exposto a luz UV que significa presença de coliformes totais e *E. coli* na amostra analisada.

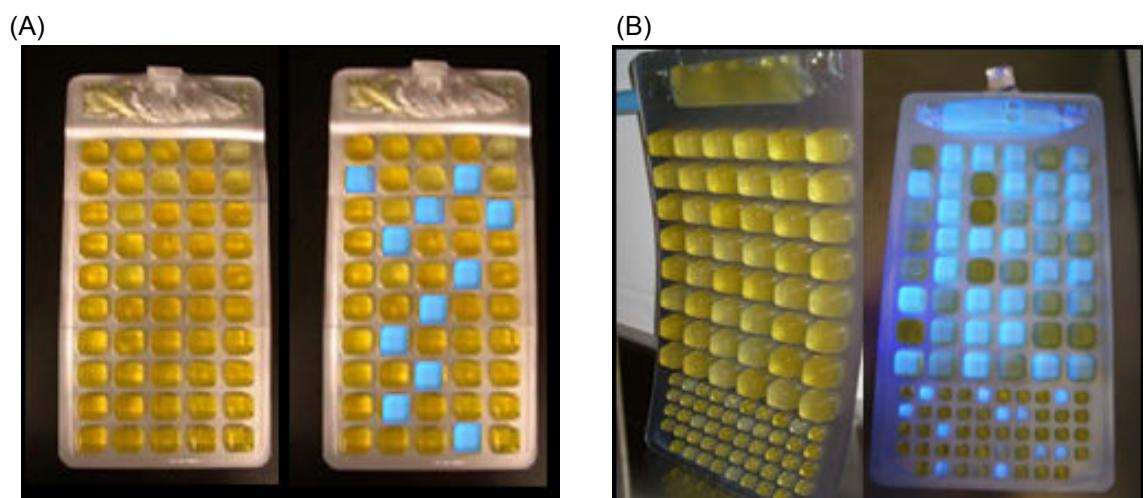
O Colilert<sup>®</sup> representa a Tecnologia Substrato Definido<sup>®</sup> mais popular e de menor custo, sendo indicada tanto para análise de água de consumo humano como para águas provenientes diretamente da fonte. Ele oferece resultados em 24/28 horas possibilitando a correção de possíveis problemas antes que o produto chegue ao consumidor (IDEXX, 2012).

Seguindo-se o mesmo princípio, a contagem de coliformes totais e de *E. coli* nas amostras de água através da Tecnologia de Substrato Definido pode ser realizada empregando-se a Técnica de Tubos Múltiplos ou os sistemas Quanti-tray<sup>®</sup> (Idexx) (A) e Quanti-tray<sup>®</sup>/2000 (Idexx) (B) que fornecem contagens simples, rápidas e precisas com base no modelo de número mais provável (NMP). O Quanti-tray<sup>®</sup> (Idexx) permite determinar NMP de 1 a 200 coliformes por 100 mL enquanto o

Quanti-tray®/2000 (Idexx) determina NMP de 1 a 2.419 coliformes por 100 mL. Os resultados são obtidos simultaneamente pela consulta de tabelas apropriadas, disponibilizadas pelo fabricante, que oferecem o NMP de coliformes totais e *E. coli* por 100 mL da amostra (INDEX, 2012) (Figura 1).

Quando comparados à Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, esses sistemas ampliam o número de combinações positivas possíveis, fornecendo assim resultados mais precisos (COELHO; PIMENTEL; BREUX, 1998).

**Figura 1** - Quanti-Tray® (Idexx) (A) e Quanti-Tray®/2000 (Idexx) (B) ilustrando a coloração amarela resultante da degradação do ONPG e fluorescência resultante da degradação do MUG.



Fonte: Idexx (2012) (A); autoria própria (B)

#### 2.7.2.2 *Colitag™ (HEXIS)*

O *Colitag™* segue o mesmo princípio do *Colilert®* para determinação de coliformes totais e *E. coli*, ou seja, também utiliza os substratos orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósideo (ONPG) e o 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo (MUG) para detectar simultaneamente esses microrganismos através da mudança de coloração dos meios causada pela degradação destes por enzimas características produzidas por essas bactérias (OLSTADT *et al.*, 2007).

Além da presença de sais de nitrogênio e fontes de carbono, o *Colitag™* apresenta em sua composição o tampão óxido de N-trimetilamina (TMAO), que ao ser transformado em trimetilamina, neutraliza o pH baixo da amostra ajudando na recuperação de células injuriadas pelo cloro, por exemplo (PALINTEST, 2012; MARQUEZI, 2010).

O uso do Colitag<sup>TM</sup> foi aprovado pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) para reativação e posterior detecção de *E. coli* danificadas pelo cloro presente na água. Essa característica de recuperação da célula danificada destaca o Colitag dos demais métodos que não conseguem detectar essas células danificadas. O resultado da análise pode ser expresso de forma qualitativa (presença/ ausência) ou de forma quantitativa através do número mais provável (NMP) em apenas 24 horas (MARQUEZI, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a equivalência entre a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos e o Sistema Enzimático Cromogênico Colilert® na resposta de detecção de coliformes em diferentes diluições.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a presença/ausência de coliformes totais e coliformes termotolerantes em diferentes concentrações de água proveniente da Lagoa do Porangabuçu.
- Determinar a quantidade de bactérias do grupo coliforme empregando as técnicas de tubos múltiplos e sistema cromogênico Colilert®.
- Avaliar a qualidade bacteriológica de amostras de água da lagoa do Porangabuçu, considerada como água não tratada, na detecção de coliformes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Foram feitas cinco amostragens de 500 mL de água da Lagoa do Porangabuçu em dias e horários diferentes.

### 4.2 Coleta

As amostras foram coletadas em frascos de vidro apropriados com tampas rosqueáveis, capacidade de 500 mL, à prova de vazamento, previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos para completa eliminação de possíveis contaminantes, sendo abertos apenas no momento da coleta e fechados imediatamente após a mesma.

Os frascos nunca foram preenchidos até a capacidade máxima, deixava-se um espaço de 1/4 para facilitar a homogeneização das amostras bem como a retirada das unidades analíticas (SILVA *et al.*, 2005).

Como não foi possível a imersão direta do frasco na água, o mesmo foi amarrado a um barbante e lançado ao leito da lagoa sendo posicionado contra a corrente e ficando a aproximadamente 30 cm da superfície para evitar a captação de contaminantes superficiais.

Posteriormente à coleta, as amostras foram guardadas em recipiente de isopor com gelo para manter a temperatura em torno de 10°C durante o transporte até o Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde as análises foram realizadas logo após a chegada (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

### 4.3 Preparação das amostras

Os procedimentos necessários para a realização das análises foram baseados nos estudos de Silva *et al.* (2005).

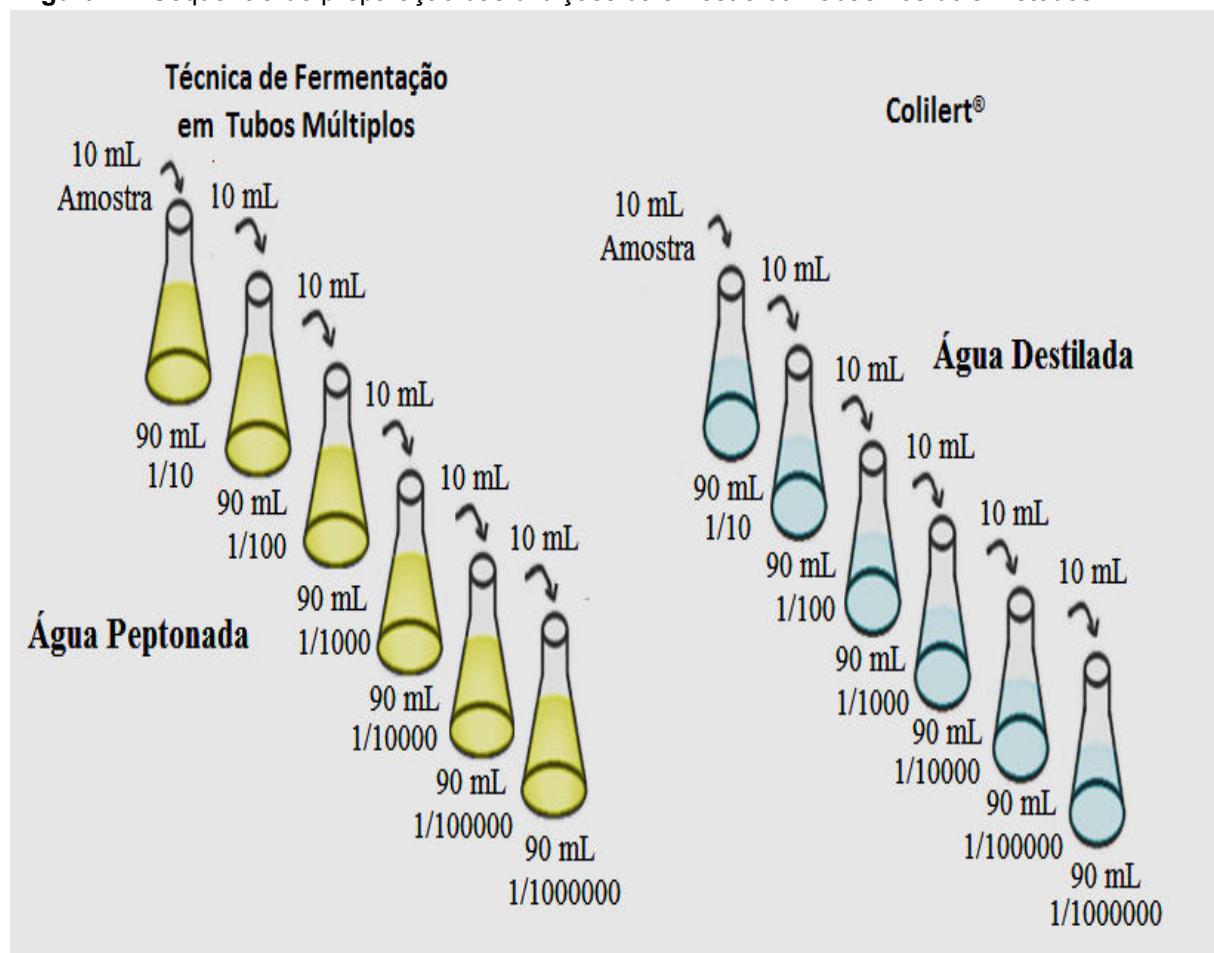
Todas as vidrarias utilizadas durante a realização dos ensaios analíticos, como pipetas, erlenmeyers, placas de Petri e tubos de ensaio contendo meios de cultura foram esterilizados, sendo as pipetas e as placas de Petri embaladas em papel alumínio e levadas à estufa a 160 °C durante 2 horas e, os meios de cultura e diluentes foram autoclavados a 121°C por 15 min. Foi efetuada a limpeza do fluxo

laminar, com álcool etílico 70%, em seguida o equipamento foi ligado por trinta minutos, para completa filtração do ar da cabine. Após esse período, o equipamento permaneceu em funcionamento até finalização dos ensaios.

As amostras foram homogeneizadas pela inversão dos frascos 25 vezes em um ângulo de 45°. Em seguida a análise foi preparada empregando diluente apropriado. Para a análise tradicional pela técnica dos Tubos Múltiplos foi empregada água peptonada 0,1% e para o substrato cromogênico (Colilert®) água destilada.

Foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta, 10 mL da amostra para um erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada 0,1%, obtendo assim uma diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram preparadas as diluições  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . O mesmo procedimento foi realizado para a preparação da amostra utilizando água destilada para o método do substrato cromogênico (Figura 2).

**Figura 2** – Sequência de preparação das diluições da amostra utilizadas nos dois métodos



Fonte: autoria própria

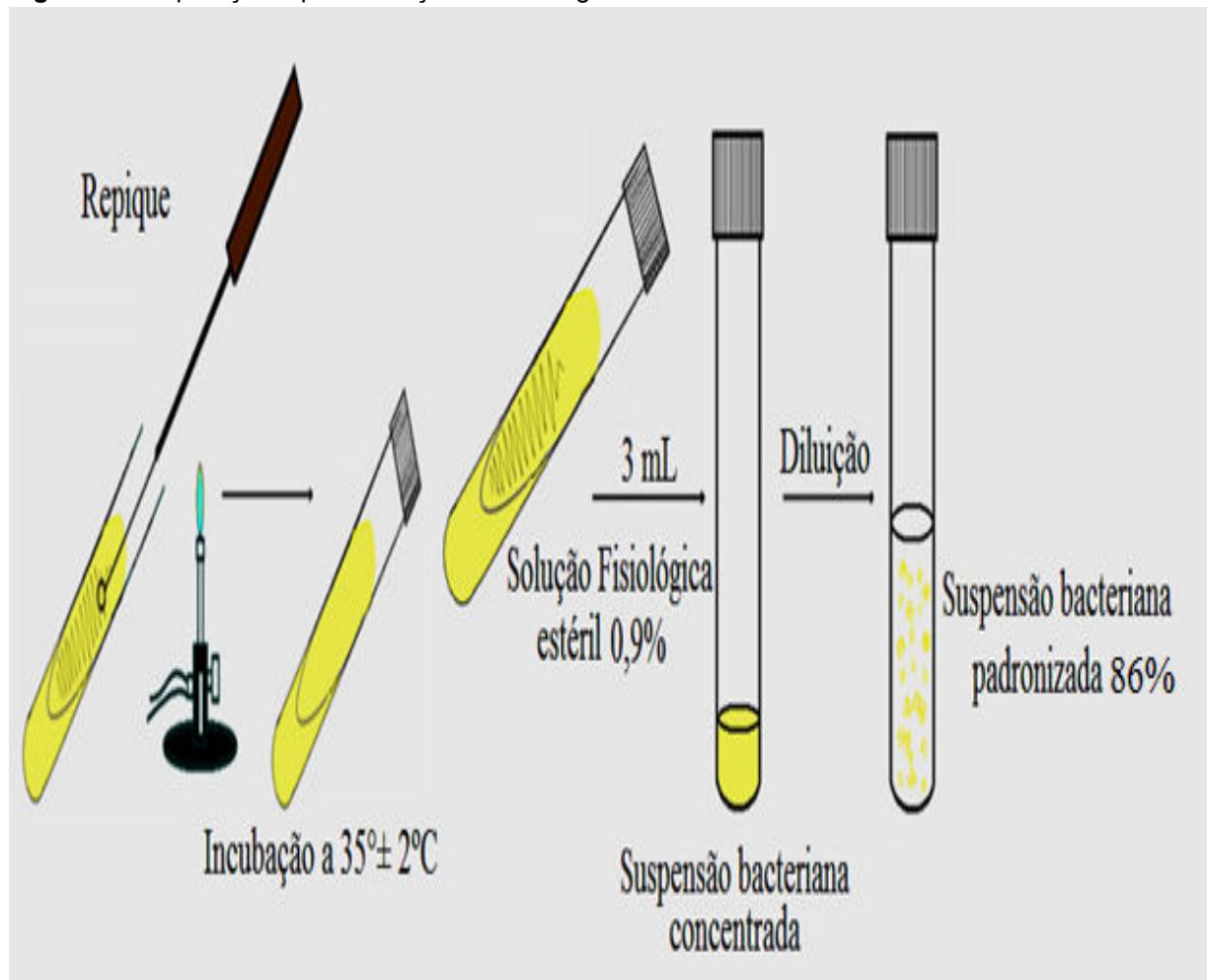
## 4.4 Análises Microbiológicas

### 4.4.1 Preparação e padronização do microrganismo teste

Para a preparação da suspensão inoculo foi utilizado o microrganismo-teste *Escherichia coli* (ATCC 25922) da coleção estoque que foi ativada em meio de cultura ágar nutritivo (AN) inclinado e incubada por 24 horas, a  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, o crescimento foi lavado com auxílio de 3,0mL de solução fisiológica estéril 0,9%, obtendo-se uma suspensão bacteriana concentrada.

Para a padronização da suspensão obtida foi feita uma série de diluições com solução fisiológica estéril 0,9% até a obtenção de 86% de transmitância em espectrofotômetro a 580 nm de comprimento de onda (Figura 3).

**Figura 3 - Preparação e padronização do microrganismo teste**



Fonte: autoria própria

#### **4.4.2 Preparação dos controles positivos e negativos**

Para garantir a eficiência do método na detecção de coliformes foram empregados, em cada análise, dois controles: o controle negativo (CN) e o controle positivo (CP).

Na técnica de fermentação em tubos múltiplos (FTM), o controle negativo (CN) foi obtido pela incubação de 10 mL dos meios de cultura (caldo lauril sulfato, caldo verde brilhante e caldo EC) contendo tubo de Durhan invertido previamente esterilizados. Este funcionou como um “padrão de ausência de crescimento”, ou seja, garantindo que os meios foram adequadamente esterilizados e, portanto estavam inócuos, não apresentando assim crescimento de microrganismos após o período de incubação.

O controle positivo (CP) foi obtido através da inoculação de 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana padronizada a 86% de transmitância, em 10 mL dos meios de cultura contendo tubo de Durhan invertido, previamente esterilizados. Este funcionou como um “padrão de presença de crescimento”, ou seja, garantindo que os meios de cultura estavam em condições satisfatórias de crescimento microbiano.

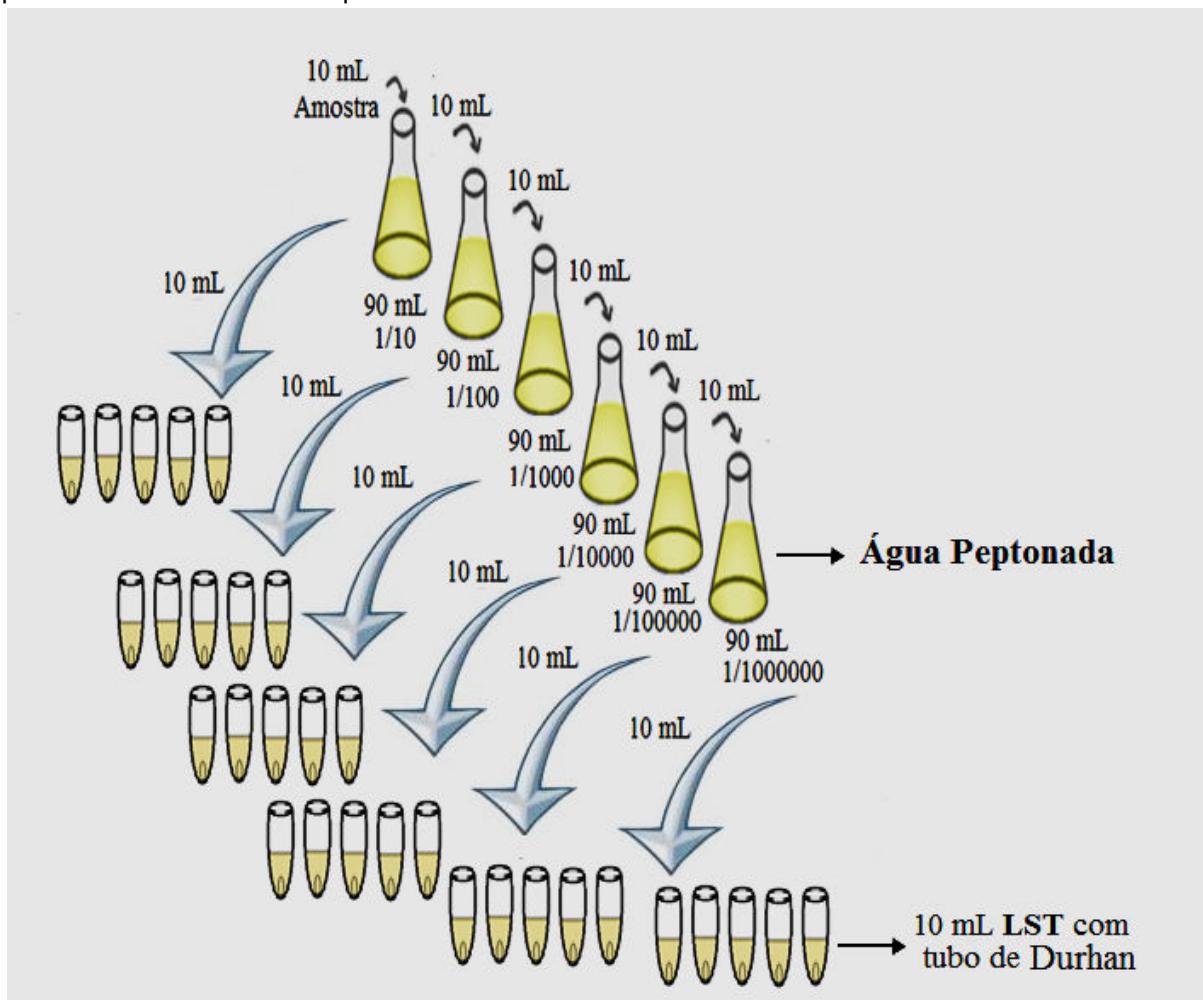
Na técnica do substrato cromogênico, os controles positivos e negativos utilizados, foram obtidos da mesma forma como na técnica de fermentação, diferenciando-se apenas pela adição do substrato Colilert® aos tubos contendo água destilada esterilizada ao invés de meios de cultura.

#### **4.4.3 Identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes**

##### **4.4.3.1 Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM)**

Na identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes foram transferidas, com auxílio de pipetas estéreis, porções de 10 mL de cada diluição, previamente preparada, para tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) em concentração dupla e um tubo de Durhan invertido em seu interior. Para cada diluição utilizou-se um série de cinco tubos de ensaio. Os tubos foram em seguida incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 às 48h (Figura 4).

**Figura 4** - Sequência de análise para identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes pela Técnica em Tubos Múltiplos



Fonte: autoria própria

A partir dos tubos com LST que apresentaram turvação e produção de gás no interior do tubo de Durhan (prova presuntiva positiva) foram transferidas, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, porções de cultura para tubos contendo 10 mL de Caldo Bile Verde Brilhante (CBVB) e um tubo de Durhan invertido incubando-os a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 às 48h.

A presença de turvação no meio, bem como a produção de gás no interior do tubo de Durhan foi considerada prova confirmatória positiva para coliformes totais (Figura 5).

**Figura 5** – Tubos contendo caldo Bile Verde Brilhante e o tubo de Durhan apresentando turvação e produção de gás



Fonte: autoria própria

A partir dos tubos com LST que apresentaram turvação e produção de gás no interior do tubo de Durhan (prova presuntiva positiva) foram transferidas, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, porções de cultura para tubos contendo 10 mL de Caldo EC com tubos de Durhan invertidos incubando-os em banho- maria a 44,5°C por 24 às 48h.

A presença de turvação no meio de cultura, bem como a produção de gás no interior dos tubos de Durhan foi considerada prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes (Figura 6).

**Figura 6** - Tubos contendo caldo EC e o tubo de Durhan apresentando turvação e produção de gás

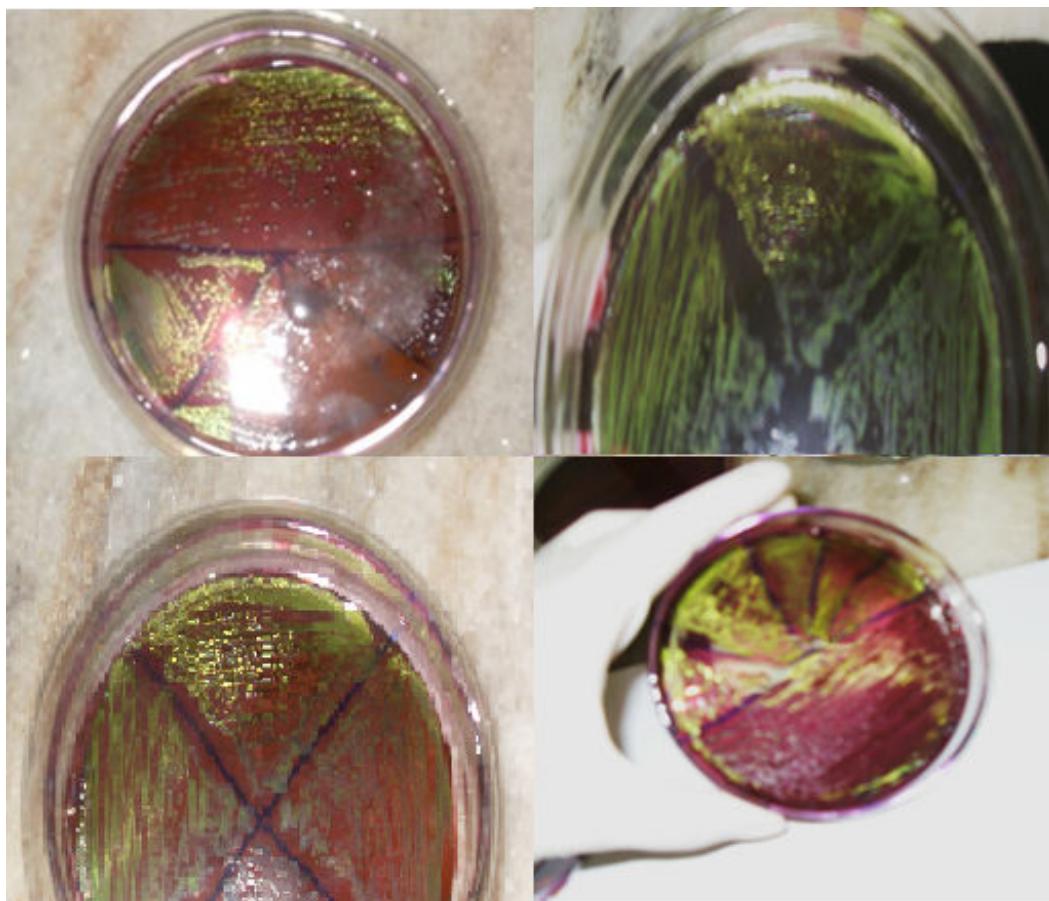


Fonte: autoria própria

A partir de cada tubo de caldo EC positivo foi realizada outra prova confirmatória através do estriamento, de alçadas do meio líquido, em placa de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metíleno (EMB).

O surgimento de colônias típicas, nucleadas, com centro preto e brilho verde metálico foi considerado prova confirmatória positiva especificamente para *E. coli* (Figura 7).

**Figura 7** – Placas contendo meio EMB com colônias nucleadas com brilho verde metálico características de *E.coli*

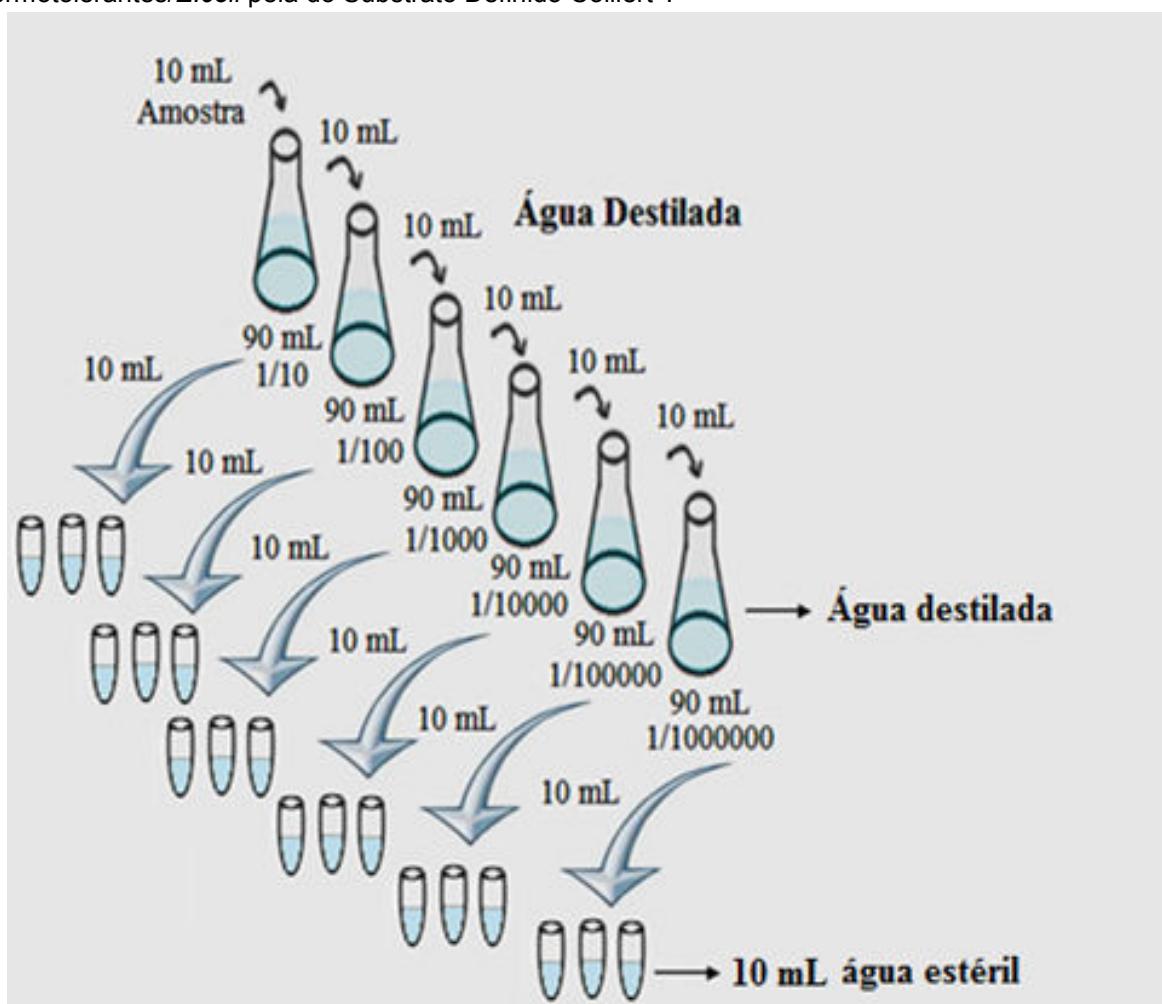


Fonte: autoria própria

#### 4.4.3.2 Técnica do Substrato Cromogênico Definido Colilert® (Idexx)

Na identificação de coliformes através desta técnica foram transferidas, com auxílio de pipetas estéreis, 3 porções de 10 mL de cada diluição, anteriormente preparada, para tubos de ensaio previamente esterilizados. Para cada diluição utilizou-se um série de 3 tubos de ensaio (Figura 8).

**Figura 8** – Sequência de análise para identificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes/*E.coli* pela do Substrato Definido Colilert®.



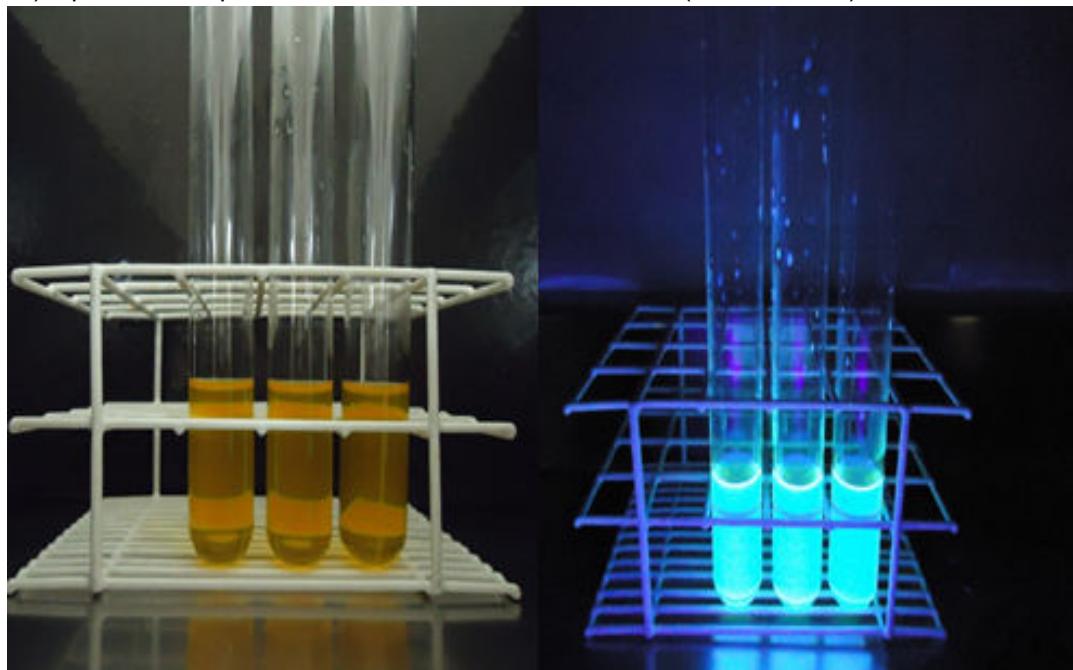
Fonte: autoria própria

Em seguida, o conteúdo do flaconete contendo o substrato Colilert® em quantidade necessária para análise em 100 mL de amostra, foi fracionado de maneira asséptica em capela de fluxo laminar, em balança analítica de forma que cada tubo de ensaio com 10 mL da diluição recebeu a quantidade necessária, em grama, de Colilert para realização da análise em 10 mL de amostra.

Cada tubo foi agitado vigorosamente até que todos os grânulos fossem dissolvidos, sendo então incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 às 48h.

A positividade para coliformes totais foi considerada pela coloração amarela desenvolvida nas diluições teste, enquanto que a positividade para coliformes termotolerantes, especificamente *E. coli*, foi considerada nos mesmos tubos pelo surgimento de fluorescência azul nas diluições através da Incidência da luz UV 365 nm (Figura 9).

**Figura 9** – Tubos contendo Colilert® apresentando positividade para coliformes totais (coloração amarela) e positividade para coliformes termotolerantes/ *E.coli* (fluorescência).



Fonte: autoria própria

Em complementação ao estudo, foi realizada a análise quantitativa de coliformes totais e termotolerantes empregando as mesmas técnicas de identificação. Os resultados da enumeração foram expressos em Número Mais Provável (NMP) / 100 mL.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de Coliformes Totais e Termotolerantes

Este trabalho proporcionou um levantamento das condições da água da Lagoa do Porangabuçu, que muitas vezes é utilizada pela comunidade residente nas suas proximidades sem antes passar por nenhum tipo de tratamento, além da comparação de duas metodologias bastante utilizadas na identificação de bactérias do grupo coliformes em água.

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises realizadas para identificação de coliformes totais e termotolerantes, através da Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, em amostras de água provenientes da Lagoa do Porangabuçu. Todas as amostras de água provenientes da lagoa também foram analisadas sem diluição pelas duas metodologias e apresentaram resultados positivos.

Tabela 1 – Resultados das amostras de água da Lagoa do Porangabuçu para coliformes totais e termotolerantes pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM)

AMOSTRA	COLIFORMES TOTAIS (diluições)						COLIFORMES TERMOTOLERANTES (diluições)					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	A
2	P	P	P	P	A	A	P	P	P	A	A	A
3	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A
4	P	P	P	P	A	A	P	P	P	A	A	A
5	P	P	P	A	A	A	P	P	P	A	A	A

P = Presença / A = Ausência

Com base na Tabela 1 é possível observar a presença de contaminação por coliformes totais e termotolerantes em todas as amostras, o que indica água de má qualidade, isto é, imprópria para as diversas formas de consumo humano.

Todas as amostras analisadas pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos apresentaram contaminação, por coliformes totais, detectada até a diluição  $10^{-3}$ .

Dessas cinco amostras analisadas, apenas uma não teve a presença de contaminação, por coliformes totais, detectada na diluição  $10^{-4}$ , o que não necessariamente representa ausência de contaminação.

Não foi detectada contaminação por coliformes totais em nenhuma das amostras na diluição  $10^{-6}$ , o que indica a sensibilidade de detecção de coliformes totais por esta metodologia.

Em relação aos coliformes termotolerantes, pode-se observar que apenas uma das cinco amostras apresentou contaminação, por coliformes termotolerantes, detectada até a diluição  $10^{-4}$ , o que não necessariamente significa resultado positivo.

A presença de coliformes termotolerantes foi detectada em todas as cinco amostras até a diluição  $10^{-3}$ .

Não foi detectada contaminação por coliformes termotolerantes em nenhuma das amostras na diluição  $10^{-5}$ , o que indica a sensibilidade de detecção de coliformes termotolerantes por esta metodologia.

Os resultados das análises realizadas para identificação de coliformes totais e termotolerantes, através do Sistema Cromogênico Colilert®, em amostras de água provenientes da Lagoa do Porangabuçu, estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Resultados das amostras coletadas na Lagoa do Porangabuçu para coliformes totais e termotolerantes através do Sistema Cromogênico Colilert®**

AMOSTRA	COLIFORMES TOTAIS (diluições)						COLIFORMES TERMOTOLERANTES (diluições)					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	A	A
2	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A
3	P	P	P	A	A	A	P	P	P	A	A	A
4	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	A	A
5	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A

P = Presença / A = Ausência

Com base na Tabela 2 também é possível observar a presença de contaminação por coliformes totais e termotolerantes em todas as amostras.

Todas as amostras analisadas pelo Sistema Cromogênico Colilert® apresentaram contaminação, por coliformes totais, detectada até a diluição  $10^{-3}$ .

Das cinco amostras analisadas pelo Sistema Cromogênico Colilert®, quatro apresentaram contaminação por coliformes totais, detectada até a diluição  $10^{-4}$ , o que não necessariamente representa ausência de contaminação, como foi observado com a técnica de tubos múltiplos.

Não foi detectada contaminação por coliformes totais em nenhuma das amostras na diluição  $10^{-6}$ , o que indica a sensibilidade de detecção de coliformes totais por esta metodologia.

Em relação aos coliformes termotolerantes, pode-se observar que apenas uma das cinco amostras não apresentou contaminação, por coliformes termotolerantes, detectada até a diluição  $10^{-4}$ , o que não necessariamente pode ser considerado como resultado negativo.

A presença de coliformes termotolerantes foi detectada em todas as cinco amostras até a diluição  $10^{-3}$ , assim como na técnica de tubos múltiplos.

Nenhuma das amostras apresentou coliformes termotolerantes detectados na diluição  $10^{-6}$ , o que indica a sensibilidade de detecção de coliformes termotolerantes por esta metodologia.

## **5.2 Comparação entre a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de Coliformes Totais e Termotolerantes**

Diversos estudos realizaram comparação entre a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® não encontrando diferenças estatisticamente significantes entre as duas metodologias, considerando-os, portanto, equivalentes (EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988,1989; EDBERG *et al.*, 1990; ECKNER, 1998).

Gale e Broberg (1993) realizaram um estudo comparativo entre essas duas técnicas onde se observou que a TFTM e o Colilert® apresentam resultados semelhantes para coliformes totais, mas o mesmo não ocorre para *E. coli*. Este resultado é análogo ao obtido no presente estudo onde, para detecção de coliformes totais, as duas técnicas apresentaram sensibilidade até a diluição  $10^{-4}$ , enquanto que, na identificação de coliformes termotolerantes (*E. coli*), apenas o Colilert® conseguiu detectar a presença nessa mesma diluição.

A Tabela 3 demonstra a comparação dos resultados das análises realizadas em amostras de água da Lagoa em estudo para identificação de coliformes totais através das duas metodologias utilizadas no trabalho.

**Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de coliformes totais**

AMOSTRA	COLIFORMES TOTAIS TFTM (diluições)						COLIFORMES TOTAIS COLILERT® (diluições)					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	A
2	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	P	A
3	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A
4	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	A	A
5	P	P	P	A	A	A	P	P	P	P	P	A

P = Presença / A = Ausência

Em todas as amostras foi evidenciada a presença de coliformes totais na diluição  $10^{-3}$  pelas duas metodologias, indicando que esta diluição representou a sensibilidade máxima na identificação de coliformes totais, sendo então a indicada para análise de água com alta densidade bacteriana.

Como anteriormente mencionado, as duas metodologias foram capazes de detectar coliformes totais na diluição  $10^{-4}$ , uma vez que quatro das cinco amostras apresentaram resultados positivos.

Pode-se observar que nenhuma das metodologias foi capaz de detectar coliformes totais na diluição  $10^{-6}$  e, portanto, esta não deve ser considerada em análise de água desta natureza.

A Tabela 4 demonstra a comparação dos resultados das análises realizadas em amostras de água da Lagoa em estudo para identificação de coliformes termotolerantes através das duas metodologias utilizadas no trabalho.

Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e o Sistema Colilert® na identificação de coliformes termotolerantes

AMOSTRA	COLIFORMES TERMOTOLERANTES TFTM (diluições)						COLIFORMES TERMOTOLERANTES COLILERT® (diluições)					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	A	A
2	P	P	P	A	A	A	P	P	P	P	P	A
3	P	P	P	A	A	A	P	P	P	A	A	A
4	P	P	P	A	A	A	P	P	P	P	A	A
5	P	P	P	A	A	A	P	P	P	P	P	A

P = Presença / A = Ausência

Em todas as amostras foi evidenciada a presença de coliformes termotolerantes na diluição  $10^{-3}$  pelas duas metodologias, indicando que esta diluição também representou a sensibilidade máxima na identificação de coliformes termotolerantes.

Também não foi possível a identificação da presença de coliformes termotolerantes na diluição  $10^{-6}$  por nenhuma das metodologias utilizadas, o que exclui a possibilidade de uso da mesma em análises de água desta natureza.

Foi observado que na diluição  $10^{-4}$  em apenas uma das cinco amostras de água foi possível detectar a presença de coliformes termotolerantes pela técnica de fermentação da lactose, enquanto que a análise pelo sistema cromogênico colilert® possibilitou a identificação em quatro das cinco amostras, exatamente o contrário dos resultados obtidos pela TFTM, o que indica que o método do Colilert® apresenta maior sensibilidade na identificação de coliformes termotolerantes, o que representa, portanto, uma vantagem da técnica na amostra mais diluída.

Essas diferenças de sensibilidade muitas vezes estão relacionadas ao tipo de água analisada, uma vez que algumas amostras, tais como água de superfície, normalmente apresentam um maior e mais diversificado número de microrganismos que as outras. Isso pode facilitar ou dificultar a análise por determinado método (MACY *et al.*, 2005).

Greghi (2005) comparou a técnica de fermentação em tubos múltiplos (TFTM) e os métodos rápidos Colilert® e Readycult® na detecção de coliformes totais e *E. coli* em diferentes tipos de água: subterrânea, superfície e tratada. A autora observou que os métodos rápidos apresentaram alta sensibilidade e especificidade para coliformes totais indicando boa concordância com a TFTM. Em relação à determinação de coliformes termotolerantes (*E. coli*), os métodos rápidos apresentaram especificidade máxima (100%) enquanto a sensibilidade foi menor para o Colilert® (> 76%) que para o Readycult® (87%). O Readycult® apresentou ótima concordância com a TFTM enquanto que o Colilert® apresentou uma concordância boa.

Os métodos rápidos apresentam, além de uma maior capacidade de recuperar e promover o crescimento das células de coliformes, uma maior especificidade desses meios para *E. coli* que a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, porém, ainda assim estes métodos apresentam boa concordância estatística (MARQUEZI, 2010).

### **5.3 Quantificação de Coliformes Totais e Termotolerantes**

A quantificação bacteriana através da técnica de fermentação foi obtida pela combinação de tubos positivos de cada diluição, em série de cinco tubos empregando-se a tabela apropriada (Anexo A).

A enumeração pelo sistema enzimático cromogênico Colilert® foi realizada pelo emprego de cartelas de contagem (Quanti-Tray®/2000) cujos resultados foram obtidos pelo emprego da tabela, fornecida pelo fabricante, apropriada para este tipo de contagem (Anexo B).

A Tabela 5 demonstra os resultados da enumeração de coliformes totais e termotolerantes pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e pelo Sistema Colilert® em amostras de água da Lagoa expressos em NMP/100 mL.

Tabela 5 - Resultados da enumeração de coliformes totais e termotolerantes pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) e pelo Sistema Colilert® em amostras de água da Lagoa (NMP/100 mL)

AMOSTRAS	COLIFORMES TOTAIS NMP/100 mL		COLIFORMES TERMOTOLERANTES NMP/100 mL	
	TFTM	QUANTI- TRAY®/ 2000 INDEXX	TFTM	QUANTI- TRAY®/ 2000 INDEXX
1	$2,80 \times 10^2$	$>2,42 \times 10^3$	$3,3 \times 10^1$	$1,37 \times 10^2$
2	$2,20 \times 10^2$	$>2,42 \times 10^3$	$1,4 \times 10^1$	$7,3 \times 10^1$
3	$1,60 \times 10^3$	$>2,42 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2$	$9,21 \times 10^2$
4	$9,00 \times 10^2$	$>2,42 \times 10^3$	$9,0 \times 10^1$	$3,31 \times 10^2$
5	$1,60 \times 10^3$	$>2,42 \times 10^3$	$1,70 \times 10^2$	$9,21 \times 10^2$
<b>MÉDIAS</b>	$9,20 \times 10^2$	$>2,42 \times 10^3$	$1,17 \times 10^2$	$4,76 \times 10^2$

Fonte: autoria própria

Através da tabela é possível observar que houve grandes variações nas contagens obtidas pelas duas metodologias empregadas. Essas diferenças entre as contagens podem ser explicadas pelo fato da água apresentar uma pobreza nutritiva que nem sempre proporciona multiplicação bacteriana, mas sim sobrevivência, o que acaba tornando a distribuição de bactérias na amostra muito heterogênea podendo levar a grandes diferenças nas contagens obtidas (MARQUEZI, 2010).

Marquezi (2010) observou em sua pesquisa, realizada em amostras de água de rio, que a TFTM apresentou uma menor contagem de coliformes totais e termotolerantes (*E. coli*) que os métodos rápidos Colilert® e Colitag™ enquanto que na contagem de *E. coli* em amostras de água da bica, a TFTM apresentou contagem maior que os métodos rápidos.

O NMP de coliformes totais/100 mL variou de  $2,20 \times 10^2$  a  $1,60 \times 10^3$  na enumeração pela TFTM enquanto pelo Colilert® não houve variação representativa uma vez que todas as contagens foram acima de  $2,42 \times 10^3$ , que representa a quantidade máxima de coliformes estipulada pela tabela.

A média obtida pela TFTM foi  $9,20 \times 10^2$ , enquanto que a obtida pelo Sistema Colilert® foi  $2,42 \times 10^3$ , o que pode indicar uma maior capacidade dos meios de cultivos utilizados no Colilert® de recuperar células, possivelmente injuriadas, de coliformes totais como já foi mencionado nesse estudo.

Diversos trabalhos destacaram a maior capacidade de detecção de bactérias tanto do grupo coliforme quanto de *E. coli* pelos métodos rápidos o que, de

certa forma, justifica a disseminação tão rápida do uso dessas técnicas (GREGHI, 2005; CHAO, K; CHAO, C; CHAO, W, 2003).

A enumeração de coliformes termotolerantes pela TFTM variou de  $1,4 \times 10^1$  a  $1,70 \times 10^2$ , enquanto que pelo Colilert® a variação foi de  $7,3 \times 10^1$  a  $9,21 \times 10^2$ . Apesar da maior variação, os NMP/ 100 mL obtidos pelo sistema cromogênico foram sempre maiores que os obtidos pela técnica de fermentação. Além disso, a média obtida pela TFTM foi  $1,17 \times 10^2$ , enquanto que a obtida pelo Sistema Colilert® foi  $4,76 \times 10^2$ , o que reforça a ideia de maior detecção de bactérias pelo método rápido.

No entanto, em um estudo para a avaliação das condições higiênico - sanitárias da água produzida por estações de tratamento, Catanusio Neto (2001), através da análise de 549 amostras, constatou equivalência entre a TFTM e o Colilert® tanto na identificação como na quantificação de coliformes totais e termotolerantes/ *E. coli* destacando a rapidez e praticidade do uso do Colilert® em relação à TFTM.

Já Schets *et al.* (2002), visando a quantificação de coliformes totais e *E. coli* em água de abastecimento público, compararam as técnicas Colilert® 18 (Idexx), plaqueamento em Ágar Chromocult Coliforme e plaqueamento em um meio específico para *E. coli* e verificaram que apesar de ser um método alternativo e apresentar contagens de coliformes totais superiores às outras técnicas, o Colilert® 18 (Idexx) apresentou contagens de *E. coli* menores que as demais.

Um estudo envolvendo 20 laboratórios de países da Europa comparou a eficiência do método Colilert® (Quanti-Tray® 2000/Idexx) com a do método convencional da Membrana Filtrante (técnica recomendada nos países europeus), constatando que a tecnologia de substrato definido detecta contagens significativamente mais elevadas de coliformes e *E. coli* que o método padrão, o que revelou menor eficiência deste em detectar este tipo de bactérias em água potável (NIEMELA; LEE; FRICKER, 2003).

Já Alves, Odorizzi e Goulart (2002) avaliaram a qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento público da cidade de Marília utilizando a técnica do Colilert® em cartela (Quanti-Tray®/Idexx) e observaram que a técnica também apresenta sensibilidade na detecção de coliformes totais e termotolerantes nesses dois tipos de água.

Yakub *et al.* (2002) observaram uma sensibilidade igual ou superior das tecnologias de substratos definidos Colilert® (Idexx) e Enterolert (Idexx) em relação a técnica convencional de Filtração em Membrana na enumeração de bactérias indicadoras em águas de superfície e efluente de esgoto tratado.

Em contrapartida, Eccles *et al.* (2004) não observaram uma variação considerável no índice de recuperação da *E. coli* ao comparar a Técnica da Membrana Filtrante e a Técnica Colilert® (Quanti-Tray® 2000/Idexx) para o isolamento e enumeração desta.

Macy *et al.* (2005) constataram que o Colilert® foi capaz de detectar a presença e quantificar bactérias do grupo coliforme e *E.coli* em amostras de água de países em desenvolvimento, podendo ser uma alternativa à Técnica da membrana Filtrante, apresentando ainda maior praticidade e oferecendo resultados em menor tempo.

Nesse estudo observou-se que tanto na quantificação de coliformes totais como na de termotolerantes existem diferenças consideráveis quando realizadas pelas Técnicas de Fermentação em Tubos Múltiplos e pelo Sistema Colilert®.

A enumeração de coliformes totais foi maior em todas as amostras quando aplicada a tecnologia do substrato definido. As contagens foram constantes,  $2,42 \times 10^3$  NMP/100 mL, para todas as amostras, enquanto que pela técnica de fermentação, a maior contagem obtida foi  $1,60 \times 10^3$ , sendo a média muitas vezes menor que a média obtida pelo Quanti- Tray®/2000 (idexx) o que corrobora com diversos outros estudos anteriormente mencionados.

Na quantificação de coliformes termotolerantes a menor contagem obtida pela TFTM foi  $1,4 \times 10^1$  NMP/100 mL, enquanto a maior foi  $1,70 \times 10^2$  NMP/100 mL. Já o Colilert® apresentou como menor contagem  $7,3 \times 10^1$  NMP/100 mL, e  $9,21 \times 10^2$  NMP/100 mL como maior.

Segundo Olstadt *et al.* (2007) essa diferença na contagem pode ser devido a presença de *Aeromonas*, que são microrganismos não coliformes que podem produzir em pequena escala a enzima  $\beta$ -galactosidase produzindo falsos-positivos nas análises pelos métodos rápidos, apesar deles apresentarem mecanismos inibidores para esses microrganismos.

## 6 CONCLUSÕES

O método convencional (Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos) e o Sistema Cromogênico Colilert® se mostraram equivalentes na identificação de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água da Lagoa do Porangabuçu.

Ambas as metodologias mostraram-se capazes de detectar coliformes totais e termotolerantes em amostras de água com alta densidade bacteriana através da aplicação de diluições seriadas.

Na quantificação de coliformes totais e termotolerantes ambas as metodologias apresentaram variações. O método rápido apresentou maiores contagens o que indicou maior capacidade de enumeração de coliformes, ou seja, uma contagem não foi equivalente à outra, podendo ser explicada pela possibilidade de presença de outras bactérias que podem interferir, gerando resultados falsos positivos.

A água da Lagoa do Porangabuçu apresentou altos níveis de contaminação de bactérias do grupo coliformes o que a torna imprópria para qualquer forma de uso humano. Para o consumo humano a água da lagoa analisada deve passar por tratamento antes de sua utilização.

## REFERÊNCIAS

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília. **Rev. Saúde Pública**, v.36, n.6, p.749-751, 2002.

AMARAL, L. A. *et al.* Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 510-514, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, D.C., 1998.

ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W. O. K.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. In: FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. **Water quality: guidelines, standards and health, risk assessment and management for water-related infectious disease**. London, cap. 13, p. 289-315, 2001.

BARRETO, E. F. Análise microbiológica da água fornecida a unidades de alimentação de regiões administrativas do Distrito Federal. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 12, n. 13, p. 7-15, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 2914, de 12 de dezembro de 2011. Normas e Padrão da potabilidade de água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 39, 14 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental relacionada à Qualidade da água para consumo humano**. Brasília, DF, 2004.

BURBARELLI, R. C. **Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em água irrigada com efluente de lagoa anaeróbica**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CALIJURI, M. C.; OLIVEIRA, R. Manejo da qualidade da água: uma abordagem metodológica. In: CASTRO, R. *et. al.* **Desenvolvimento sustentado: problemas e estratégicas**. 1. ed. São Carlos: EESC-USP, v. 1, cap. 1, p. 39-58, 2000.

CARMOUZE, J. P. **O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos**: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher, 1994.

CATANUSIO NETO, R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. **Hig. Alim.**, v. 15, n. 90/91, 2001.

CHAO, K. K.; CHAO, C. C.; CHAO, W. L. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of

subtropical freshwater environments. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, London, v. 36, n. 4, p. 288-293, 2003.

COELHO, D. L.; PIMENTEL, I. C.; BREUX, M. R. Uso do método do substrato cromogênico para quantificação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme em águas minerais envasadas. **Bol. CEPPA**, Curitiba, v. 16, p.45-54, 1998.

COVERT, T. C. *et al.* Evaluation of the auto-analysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 2443-2447, 1989.

D`AGUILA, P. S. *et al.* Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, p. 791-798, 2000.

DAVID, P. R. B. S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento de alguns pontos da cidade do Recife, PE: um relatório de experiência de alunos do mestrado em nutrição da UFPE. **Hig. Alim.**, v. 13, p. 36-41, 1999.

ECCLES, J. P. *et al.* A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. **J. Appl. Microbiol.**, v. 96, n. 2, p. 375-383, 2004.

ECKNER, K. F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform Bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Sweden. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, n. 8, p. 3079–3083, 1998.

EDBERG, S. C., ALLEN, M. J.; SMITH, D. B. The National Collaborative Study National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with presence-absence techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1003–1008, 1989

EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J.; SMITH, D. B. The National Collaborative Study National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1595–1160, 1988.

EDBERG, S. C. *et al.* Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, n. 2, p. 366–369, 1990.

FORTES, F. B. B. **Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, p. 651-660, 2001.

GALE, P.; BROBERG, P. J. Evaluation of a rapid, defined substrate technology method for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in chlorinated drinking water. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 17, p. 200–203, 1993.

GIOMBELLI, A.; RECH, H.; TORRES, V. S. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da região do Alto Uruguai Catarinense. **Hig. Aliment.**, v. 12, p. 49-51, 1998.

GREGHI, S. Q. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de agua em comparação com a técnica da fermentação em tubos múltiplos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2005.

HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. S. M Microbiologia sanitária: indicadores microbiológicos de qualidade sanitária. In: ROITMAN, I. et al. (Ed.). **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, v. 1, p. 83-102, 1988.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte comunicações e editora, 1998.

HUNT, H. E.; RICE, E. W. Microbiological examinations. In: EATON, A. D. (Ed.). **Standard methods for examination of water & wastewater**. 21th ed. Washington: APHA, Pt. 9000, p. 9-1 – 9- 169, 2005.

IDEXX LABORATORIES. Disponível em:< <http://www.idexx.com>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

ISAAC-MARQUEZ, A. P. et al. Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano em Campeche. **Salud Pública Méx.**, v. 36, n. 6, p. 655-661, 1994.

JAY, J. M. Parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento microbiano. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 3, p. 51-72.

JULIÃO, F. C. **Água para consumo humano e saúde**: ainda uma iniquidade em área periférica do município de Ribeirão Preto- SP. Dissertação (Mestrado) – “Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto”, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

LEITE, M. O.; FRANCO, M. F. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializadas no Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 13, n. 2, p. 80-83, maio/ago. 2006.

LESER, W. S. *et al.* **Elementos de Epidemiologia Geral**. São Paulo: Atheneu, 1985.

LIMA, J.E.F.W. Recursos hídricos no Brasil e no mundo. Planaltina: EMBRAPA, 2001. 44 p. Disponível em:< [www.cpac.embrapa.br](http://www.cpac.embrapa.br)>. Acesso em: 17 fev. 2012.

MACEDO, J. A. B. **Águas e águas**. 3. ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2007.

MACY, J. T. *et al.* Comparison of two methods for evaluating water quality. **J. Water Health**, v. 3, n.3 p.221-228, 2005.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and Chromogenic Substrates Use in Bacterial Diagnostics. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n. 3, p. 335-348, 1991.

MARQUEZI, M. C. **Comparação de metodologias para estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água**. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MARTINS, A. S. **Análises de Impacto Ambiental através do Estudo de Parâmetros Físico-Químicos e Bacteriológicos no Igarapé Próximo do Campus da UNIR sob Influência do Lixão Municipal**. Dissertação (Monografia) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2006.

MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; HAGLER, A. N. Microbiologia aquática. In: ROITMAN, I. TRAVASSOS; L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, v.2. cap. 4, p. 83-102, 1991.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecol. Desenvol. Rural Sustent.**, Porto Alegre, v.3, n.4, out./dez. 2002.

MOITA, R.; CUDO, K. Aspectos gerais da qualidade da água no Brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA SOBRE QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO E SAÚDE NO BRASIL, 1991, Brasília. **Anais...** Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria do Meio Ambiente, p.1-6, 1991.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, jun. 2002.

MORELLI, A. M. F. **Isolamento de Enterococos e Coliformes Fecais de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

NIEMELA, S. I.; LEE, J. V.; FRICKER; C. R. A comparison of the international standards organization reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure. **J. Appl. Microbiol.**, v.95, p.1285-1292, 2003.

OLSTADT, J. *et al.* A comparison of ten USEPA approved total coliform/ *E. coli* tests. **J. Water Health**, London, v. 5, n. 2, p. 267 – 282, 2007.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **Guía para la vigilancia y el control de la calidad del agua en situaciones de emergencia y desastre**. Washington, 2007. Disponível em:<[http://www.paho.org/spanish/dd/ped/VigilanciaCalidadAgua\\_intro.pdf](http://www.paho.org/spanish/dd/ped/VigilanciaCalidadAgua_intro.pdf)>. Acesso em: 2 mar. 2012.

PAIVA, S. C.; SALGUEIRO, A. A. Impacto ambiental na lagoa Olho d'Água em Jaboatão dos Guararapes- PE. **Rev. Quim. Tecnol.**, ano 1, p. 39, jul./dez. 2002.

PALINTEST. Disponível em: <<http://www.palintest.com>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

PELCZAR JÚNIOR, R. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1997. 524p.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição do sistema hídrico. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

RICHTER. C. A.; AZEVEDO NETTO, J. M. **Tratamento de água**: tecnologia atualizada. São Paulo: Edgard Blucher, 1995.

RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. Degradação dos recursos hídricos e saúde humana: uma atualização. **Rev. Saúde Ambiente**, v. 10, n. 1, jun. 2009.

SÁ, M. U. **Avaliação da Mutagenicidade das Águas do Canal São Gonçalo, Pelotas, RS, 2005**. Monografia - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2006.

SANTOS, S. R, **Tratamento da água**: monitoramento das características da qualidade da água potável. 2007. 261 p. Dissertação (Mestrado em Programação Matemática do Setor de Tecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SCHETS, F. M. *et a.* EUA drinking water directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 34, n.3, p. 227-231, 2002

SILVA, E. F.; SALGUEIRO, A. A Avaliação da qualidade bacteriológica de água de poços na região de Recife- PE. **Hig. Alim.** v.15, p.73-78, 2001.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** Campinas: ITAL/ Núcleo de Microbiologia, 2000.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** São Paulo: Varela, 2005.

SPERLING, M. V. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias:** Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

STUKEL, T. A. *et al.* A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies. **Environ. Sci. Technol.**, v. 24, p. 571-575, 1990.

TEIXEIRA, J. C. **Vigilância da qualidade da água para consumo humano:** utopia ou realidade? Estudo de caso: Juiz de Fora, MG: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.

UNIAGUA (Universidade da água). **Água no planeta.** Disponível em: <[www.uniagua.org.com.br/aguanooplaneta](http://www.uniagua.org.com.br/aguanooplaneta)>. Acesso em: 20 fev. 2012.

VASCONCELOS, J. C.; AQUINO, J. S. de. Análise microbiológica (potabilidade) da água consumida em escolas públicas de conjuntos habitacionais da zona oeste de Manaus- Amazonas. **Bol. CEPPA**, Curitiba, v.13, p. 119-124, 1995.

VERTONI, P. C.; GALLO, C. R. **Utilização de cloradores por difusão em poços rasos:** cisternas para garantia da potabilidade da água. Piracicaba: ESALQ/USP; SEBRAE, 66p. (Cursos Agrozootécnicos), 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality.** 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, 1996.

YAKUB, G. P. *et al.* Evaluation of colilert and enterolert defined substrate methodology for wastewater applications. **Water Environ. Res.**, v. 74, p. 131-135, 2002.

## ANEXOS

**ANEXO A – Número Mais Provável (NMP/ 100 mL) e intervalo de confiança 95% para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 5 porções de 10mL da amostra por tubo (APHA, 1998).**

Nº DE TUBOS POSITIVOS	NMP/ 100 mL	INTERVALOS DE CONFIANÇA 95% (valores aproximados)	
		mínimo	máximo
0-0-0	< 2	1.0	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	4	1.0	15
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	6	2.0	18
2-0-1	4	1.0	17
2-1-0	7	2.0	20
2-1-1	7	2.0	21
2-2-0	9	3.0	24
2-3-0	9	3.0	25
3-0-0	12	5.0	29
3-0-1	8	3.0	24
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	11	4.0	29
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	14	6.0	35
4-0-0	17	7.0	40
4-0-1	13	5.0	38
4-1-0	17	7.0	45
4-1-1	17	7.0	46
4-1-2	21	9.0	55
4-2-0	26	12.0	63
4-2-1	22	9.0	56
4-3-0	26	12.0	65
4-3-1	27	12.0	67
4-4-0	33	15.0	77
5-0-0	34	16.0	80
5-0-1	23	9.0	86
5-0-2	30	10.0	110
5-1-0	40	20.0	110
5-1-0	30	10.0	120
5-1-1	50	20.0	150
5-1-2	60	30.0	180
5-2-0	50	20.0	170
5-2-1	70	30.0	210
5-2-2	90	40.0	250
5-3-0	80	30.0	250
5-3-1	110	40.0	300

**ANEXO A** – Número Mais Provável (NMP/ 100m) e intervalo de confiança 95% para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 5 porções de 10 mL da amostra por tubo (APHA, 1998) – continua.

<b>5-3-2</b>	140	60.0	360
<b>5-3-3</b>	170	80.0	410
<b>5-4-0</b>	130	50.0	390
<b>5-4-1</b>	170	70.0	480
<b>5-4-2</b>	220	100.0	580
<b>5-4-3</b>	280	120.0	690
<b>5-4-4</b>	350	160.0	820
<b>5-5-0</b>	240	100.0	940
<b>5-5-1</b>	300	100.0	1300
<b>5-5-2</b>	500	200.0	2000
<b>5-5-3</b>	900	300.0	2900
<b>5-5-4</b>	1600	600.0	5300
<b>5-5-5</b>	>1600	-	-

**ANEXO B - Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança 95% para o número de cavidades com reação positiva para o Quanti-Tray® 2000 (IDEXX) (IDEXX, 2012).**

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																								
	# Small Wells Positive																								
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.8	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.8	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.8	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.8	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.8	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	38.9	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.8	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.8	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.8	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.8	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.8	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.8	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.8	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2																							

**ANEXO B - Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança 95% para o número de cavidades com reação positiva para o Quanti-Tray® 2000 (Idexx) (IDEXX, 2012) – continua.**

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																							
	# Small Wells Positive																							
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.8	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.8	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.8	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.8	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.8
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.8	93.8	95.8	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.8	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.8	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	108.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.8	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.8	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2											