

SIMONE DE QUEIRÓZ GREGHI

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS RÁPIDOS USADOS PARA
DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES FECAIS EM AMOSTRAS
DE ÁGUA, EM COMPARAÇÃO COM A TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM
TUBOS MÚLTIPLOS”.**

ARARAQUARA

2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA**

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS RÁPIDOS USADOS PARA
DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES FECAIS EM AMOSTRAS
DE ÁGUA, EM COMPARAÇÃO COM A TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM
TUBOS MÚLTIPLOS”.**

SIMONE DE QUEIRÓZ GREGHI

Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição- Área de
Ciências dos Alimentos para obtenção do Grau
de Mestre

PROF^a. DR^a. MARIA DA PENHA LONGO MORTATTI CATANOZI

Orientadora

PROF. DR. ADALBERTO FARACHE FILHO

Co-Orientador

ARARAQUARA

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. Adalberto Farache Filho

Prof. Dr. Wellington Cyro de Almeida Leite

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 30 de Junho de 2005

DEDICATÓRIA

A Deus que me deu a vida e fortaleza

para terminar este estudo,

Aos meus Pais, José Armando e Ana Lúcia, por estarem aqui quando

eu mais os necessitava, pela ajuda e constante cooperação,

Aos meus irmãos, Marcelo e Viviane, pela força e apoio e

A minha sobrinha Samara, que já amo muito, e que nos proporcionou

uma alegria imensa com seu nascimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar mais este sonho.

Aos meus pais, irmãos e namorado, pela paciência compreensão e incentivo.

Aos professores e funcionários participantes dessa pesquisa pelo empenho, disponibilidade e simpatia que demonstraram durante todo o curso.

A todos os meus professores do Mestrado, em especial ao meu professor e co-orientador Adalberto, que muito contribuiu com meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional durante os anos de curso.

A minha professora e orientadora Maria da Penha, cujo carinho, incentivo e dedicação transcenderam em muito as exigências do seu papel e da sua responsabilidade.

Aos meus tios Nilton, Nilza, Anésio e Rosely pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao primo Luiz Sérgio pela orientação e força.

Aos amigos, simplesmente por serem amigos.

Difícil não é lutar
pelo que mais se quer,
mas sim, distanciar-se
de quem se ama.

RESUMO

A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarréicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação da sua qualidade microbiológica. Métodos que permitam a identificação de bactérias indicadoras, como os coliformes, são preferidos para estas análises, pois sua presença indica a possível existência de patógenos. Como existem diversos métodos que podem ser utilizados para esta finalidade, o objetivo deste estudo foi comparar a eficiência dos métodos rápidos Colilert (Idexx) (TSD-C) e ReadyCult Coliformes (Merck) (TSD-R) com a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM), para a determinação de bactérias coliformes totais, coliformes fecais, em amostras de águas de diversas origens. Foram analisadas 219 amostras divididas em 3 grupos águas de sistemas de abastecimento público, águas de superfície e águas subterrâneas, que foram coletadas no período de dezembro de 2002 a junho de 2003. Para a quantificação de coliformes totais observou-se nos métodos Colilert e ReadyCult que a sensibilidade e a especificidade foram altas, (> 95%), e o coeficiente *kappa* foi muito próximo de 1, indicando concordância ótima entre estas técnicas e a TFTM. Para a determinação de coliformes fecais observou-se que a especificidade foi máxima (100%) em ambos os métodos rápidos, a sensibilidade foi alta para o método ReadyCult (87%), mas menor para o método Colilert (> 76%); o coeficiente *kappa* foi alto para o método ReadyCult (0,85), e menor para o método Colilert (0,74) indicando concordâncias ótima e boa, respectivamente. O uso destas técnicas permite a obtenção de resultados em 24 horas, representando grande vantagem pela rapidez e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento.

Palavras chaves: Análise Bacteriológica, Métodos Rápidos, Colilert, ReadyCult, Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, Coliformes totais, Coliformes fecais, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The water used for human intake is one of the most important vehicles for infective diarrheic diseases, which make the evaluation of its microbiological quality fundamental. Methods that allow the identification of indicative bacteria are preferred for these types of analyses. The presence of faeces contamination such as coliformes, indicates the possible existence of pathogens. Since there are several methods that could be used for this purpose, the objective of this study was to compare the efficiency of the quick methods. The methods Colilert (Idexx) (DST-C) and ReadyCult Coliforms (Merck) (DST-R) with the Technique of Fermentation in Multiple Tubes (TFTM), were considered for the determination of total coliform, fecal coliforms, in samples of water from several sources. The study analyzed 219 samples collected in the period between December 2002 and June 2003. These samples were divided into 3 groups: general public/ water supply systems; surface waters and underground waters. Colilert and ReadyCult methods were used to quantify total coliforms contamination. Sensibility and specificity were high, over 95%. The *kappa* coefficient was verging on 1, indicating a positive correlation between these techniques and TFTM. To determine fecal contamination it was noticed that the specificity was at its maximum (100%) in both quick methods and the sensibility was high for the ReadyCult method (87%), but slightly lower for the Colilert, over 76%. The *kappa* coefficient was high for the ReadyCult method (0,85), and lower for the Colilert methods (0,74), indicating a positive correlation. The use of these techniques enables the ability obtain the results in 24 hours, offering great advantages in its speed and the possibility of correcting existing problems, in current water supply systems.

Key words: Bacteriologic Analysis, Quick Methods, Colilert, ReadyCult, Technique of Fermentation in Multiple Tubes, total coliforms bacteria, fecal coliforms, *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a- Unidades Filtrantes para filtração a vácuo (150mL a 1L).....	31
Figura 1b- Membrana Filtrante.....	31
Figura 2- Esquema da reação enzimática do substrato ONPG (IDEXX, 2005).....	34
Figura 3- Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005).....	34
Figura 4- Mudança de coloração na reação enzimática ONPG/MUG (IDEXX, 2005).....	35
Figura 5- Mudança de coloração na reação enzimática CPRG/MUG (IDEXX, 2005).....	36
Figura 6- Esquema da reação enzimática do substrato CPRG (IDEXX, 2005).....	37
Figura 7- Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005).....	37
Figura 8- Esquema da reação enzimática do substrato X-GAL.....	39
Figura 9- Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005).....	39
Figura 10- Mudança de coloração na reação enzimática X-GAL/MUG (MERCK, 2005).....	40
Figura 11- Tecnologia do substrato cromogênico ONPG empregando a Técnica de Tubos Múltiplos.....	41
Figura 12- Quanti-Tray®(Idexx) (a) e Quanti-Tray®/2000(Idexx) (b) ilustrando a mudança de coloração quando o substrato ONPG é degradado (coloração amarela) (IDEXX, 2005).....	42
Figura 13- Quanti-Tray®(Idexx) (a) e Quanti-Tray®/2000(Idexx) (b) ilustrando a mudança de coloração quando o substrato CPRG é degradado (coloração magenta) (IDEXX, 2005).....	43

Figura 14- Quanti-Tray®(Idexx) (a) e Quanti-Tray®/2000(Idexx) (b) ilustrando a fluorescência azul quando o substrato MUG é degradado (IDEXX, 2005).....	43
Figura 15- Esquema de análise para determinação de coliformes totais e coliformes fecais pela Técnica em Tubos Múltiplos (SILVA, 2000).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Interpretação do valor de <i>kappa</i>	54
Tabela 2- Distribuição dos resultados das análises de acordo com os métodos empregados.....	56
Tabela 3- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de Sistemas de Abastecimento Público (água tratada) determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).....	58
Tabela 4- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de sistemas de abastecimento público (água tratada) determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).....	58
Tabela 5- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de superfície determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)...	59
Tabela 6- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de superfície determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)...	60
Tabela 7- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água subterrânea determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)	61
Tabela 8- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água subterrânea determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)	62

Tabela 9- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 219 amostras de água de diferentes origens determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)	63
Tabela 10- Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 219 amostras de água de diferentes origens determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).....	63
Tabela 11- Número de concordâncias de resultados de determinações de coliformes totais das técnicas de análise em relação ao total de determinação da TFTM.....	65
Tabela 12- Número de concordâncias de resultados de determinações de coliformes fecais das técnicas de análise em relação ao total de determinação da TFTM.....	65
Tabela 13- Números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes quando foram empregadas as técnicas TSD-C comparada com a TFTM e TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes totais.....	67
Tabela 14 - Números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes quando foram empregadas as técnicas TSD-C comparada com a TFTM e TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes fecais.....	67

LISTA DE SIGLAS

APHA- American Public Health Association.....	29
CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.....	49
C.F.- Coliformes fecais.....	27
CLBVB- Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante.....	51
CPRG- Vermelho de Clorofenil- β -D-Galactopiranosídeo.....	36
C.T.- Coliformes Totais.....	27
FDA- Food and Drug Administration.....	29
ICMSF- International Commission on Microbiological Specification for Foods.....	26
LST- Lauril Sulfato Triptose.....	51
MUG- 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo.....	35
NMP- Número Mais Provável.....	17
OMS- Organização Mundial de Saúde.....	16
ONPG- Orto-Nitrofenil- β -D-Galactopiranosídeo.....	33
TFTM- Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos.....	30
TSD- Tecnologia dos Substratos Definidos.....	41
TSD-C- Tecnologia do Substrato Definido Colilert.....	48
TSD-R- Tecnologia do Substrato Definido Readyult.....	48
UFC- Unidade Formadora de Colônias.....	17
WHO- World Health Organization.....	28
XGAL- 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D- Galactopiranosídeo.....	38

LISTA DE APÊNDICE E ANEXOS

APÊNDICE A

Tabela 1 – Determinação de C.T. e C.F., em NMP/100ml, em 73 amostras de águas de sistemas de abastecimento público (água tratada) pelo emprego das Técnicas TSD-C, TSD-R e TFTM.....	85
Tabela 2 – Determinação de C.T. e C.F., em NMP/100ml, em 73 amostras de águas de superfície (rios, córregos, riachos, represas e lagos) pelo emprego das Técnicas TSD-C, TSD-R e TFTM.....	88
Tabela 3 - Determinação de C.T. e C.F., em NMP/100ml, em 73 amostras de águas subterrâneas (poços rasos, nascentes e poços profundos) pelo emprego das Técnicas TSD-C, TSD-R e TFTM.....	91

ANEXO A

Tabela 1 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de porções de 10mL da amostra por tubo (APHA,1998).....	95
Tabela 2 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 5 porções de 10mL da amostra por tubo (APHA,1998).....	95
Tabela 3 - Índice do NMP e limites de confiança de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos quando 5 tubos são usados por diluição da amostra por tubo (APHA,1998)	96

ANEXO B

Tabela 1 - Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade, para o número de cavidades com reação	
---	--

positiva para o Quanti-Tray®(Idexx, 2005)..... 99

Tabela 2 - Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade, para o número de cavidades com reação positiva para o Quanti-Tray® 2000(Idexx, 2005)..... 101

ANEXO C

Tabela 1 - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2004)..... 103

Tabela 2 - Número mínimo de amostras mensais para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento público, para fins de análises microbiológicas, em função da população abastecida (BRASIL, 2004)..... 103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Qualidade da água.....	19
2.2 Contaminação da água.....	22
2.3 Microrganismos indicadores.....	26
2.3.1 Coliformes totais (C.T.).....	27
2.3.2 Coliformes fecais (C.F.) e <i>Escherichia coli</i>	27
2.4 Métodos de análise microbiológica de água.....	29
2.4.1 Métodos convencionais.....	29
2.4.1.1 Determinação de C.T. e C.F. pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos.....	30
2.4.1.2 Determinação de C.T. e C.F. pela técnica da Membrana Filtrante.....	31
2.4.2 Métodos rápidos.....	32
2.4.2.1 Tecnologia do substrato enzimático Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG)- Colilert [®] (Idexx), Colilert 18 [®] (Idexx) e Coliquick [®] (Hach).....	33
2.4.2.2 Tecnologia do substrato enzimático vermelho de clorofenil- β -D-galactopiranosídeo (CPRG)- Colisure [®] (Idexx)	36
2.4.2.3 Tecnologia do substrato enzimático 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL)- Fluorocult LMX [®] (Merck) ou Readycult Coliformes [®] (Merck).....	38
2.4.2.4 Tecnologia do Substrato Definido (TSD) em cartela ou empregando a Técnica de Tubos Múltiplos.....	41
2.4.3 Outros estudos realizados utilizando a Tecnologia dos Substratos Definidos...	43

3 OBJETIVOS.....	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Amostragem.....	49
4.2 Coleta das amostras.....	49
4.3 Análises microbiológicas.....	50
4.3.1 Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes fecais.....	51
4.3.2 Técnica do Substrato Definido utilizando o substrato Colilert [®] (Idexx)(TSD-C) para determinação de coliformes totais, coliformes fecais/ <i>E. coli</i>	52
4.3.3 Técnica do Substrato Definido utilizando o substrato Readycult Coliformes [®] (Merck) (TSD-R) para determinação de coliformes totais, coliformes fecais e <i>E. coli</i>	53
4.4 Análise Estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Resultados das análises de coliformes totais e coliformes fecais, expressos em NMP/ 100mL.....	57
5.2 Resultados das análises de coliformes totais e coliformes fecais, classificados em positivos ou negativos.....	66
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
APÊNDICES.....	84
ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O propósito primário de estudar métodos para analisar a qualidade da água está diretamente relacionado à proteção à saúde pública.

Os critérios adotados para assegurar a qualidade da água têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que, se propriamente implementadas 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).

O melhor método de assegurar água adequada para consumo consiste em formas de proteção, evitando-se as contaminações por dejetos animais e humanos, os quais podem conter grande variedade de bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Falhas na proteção e no tratamento efetivo expõem a comunidade a riscos de doenças intestinais e a outras doenças infecciosas (BROMBERG, 1995; HELLER, 1998).

A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica (ISAAC-MARQUEZ et al., 1994). As doenças de veiculação hídrica são ocasionadas, principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitida basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos com a água ou alimento contaminado pela água poluída com fezes (GRABOW, 1996; AMARAL et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como água potável aquela com aspecto límpido e transparente e que não contenha cheiro ou gosto objetáveis, não contenha nenhum tipo de microrganismo que possa causar doenças ao ser

humano e também substâncias em concentrações que possam causar prejuízos à saúde (BRASIL, 2004). Com base nessa definição é que são estabelecidos os padrões de potabilidade para as águas destinadas ao abastecimento público.

No Brasil, os padrões são definidos pelo Ministério da Saúde através da Portaria n.º 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004) que determina o número mínimo de amostras ou planos de amostragem, além dos padrões para água potável restritos ao trecho que se inicia na captação e se encerra nas ligações domiciliares dos consumidores.

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 et al., 1998).

Diante das dificuldades para identificação de todos os microrganismos patogênicos na água, dá-se preferência a técnicas que permitam a identificação de bactérias indicadoras, como os coliformes, cuja presença indica a possível existência de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os métodos tradicionais freqüentemente utilizados para enumeração de coliformes são a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos e Técnica da Membrana Filtrante. O primeiro é um método trabalhoso, que emprega grande quantidade de meios de cultura e vidrarias, envolve repiques e necessita longo tempo de incubação, chegando a 96 horas para enumeração de coliformes totais e fecais. A técnica de filtração em membrana permite a visualização do número de colônias de microrganismos existentes, expressando o resultado em unidades formadoras de colônias (UFC/100mL), porém é necessário o equipamento para

filtração (de custo elevado) e não é indicado para águas com turbidez elevada o 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.

O uso da técnica de substratos cromogênicos ou definidos permite determinar simultaneamente, coliformes totais e coliformes fecais presentes em amostras de água, utilizando apenas um meio de cultura. O tempo necessário para a obtenção dos resultados confirmados varia entre 18 e 28 horas, dependendo do produto comercial utilizado, representando grande vantagem pela rapidez do resultado e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento público.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Qualidade da água

A água é uma substância de fundamental importância para todos os seres vivos, pois sua presença é vital para o funcionamento das atividades celulares e orgânicas, além de corresponder a dois terços da massa corporal humana (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 (vapor), entre outros (DAVID et al., 1999).

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

A água necessária para suprir todas as exigências do mundo moderno provém de mananciais de superfície ou subterrâneo (SILVA; SALGUEIRO, 2001).

A água subterrânea além de ser bem econômico é considerada mundialmente uma fonte imprescindível de abastecimento para o consumo humano, principalmente para populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento ou mesmo para aqueles que tendo acesso, têm o fornecimento irregular. Suas fontes de contaminação estão, em geral, associadas a despejos domésticos, industriais e ao chorume oriundo de aterros de resíduos sólidos, que quando dispostos de forma inadequada podem poluir e contaminar os lençóis freáticos com microrganismos patogênicos (FREITAS et al., 2001).

A poluição de lençóis freáticos, rios e lagos, ocorrem por precipitação de poluentes atmosféricos e por escoamento superficial, que carregam excrementos animais, fertilizantes e pesticidas, e também por infiltração e percolação de águas originadas de fossas sépticas, de lagoa de estabilização e de aterros sanitários (MOTA, 1997).

As águas superficiais provenientes de rios e lagos, quando destinadas ao abastecimento público e para que possam ser utilizadas para o consumo humano, devem reunir certos requisitos químicos, físicos e microbiológicos, enquadrando-se assim no conceito de água potável (DAVID et al., 1999).

A qualidade da água potável pode sofrer uma série de mudanças durante o trajeto, nos sistemas de distribuição, fazendo com que a que chega ao usuário seja diferente daquela que deixa a estação de tratamento. Tais mudanças podem ser causadas por variações químicas, microbiológicas ou por uma perda de integridade do sistema (FREITAS et al., 2001).

Devido aos grandes problemas econômicos e estruturais enfrentados por países de terceiro mundo, um número cada vez maior de cidades apresenta quadros preocupantes quanto à infra-estrutura de saneamento básico, que se considerado como prioritário, poderia prevenir a ocorrência de muitas doenças. Esse fato resulta no aumento do número de casos de doenças parasitárias e infecciosas, e conseqüente elevação dos gastos com a Saúde Pública (DAVID et al., 1999; D'AGUILA et al., 2000).

Dentre as principais doenças de veiculação hídrica, transmitidas por águas contaminadas, pode-se citar a febre tifóide, cólera, salmonelose, shigelose, poliomielite, hepatite A, parasitoses, desintérias bacilares e amebianas, responsáveis por vários surtos epidêmicos e pelas elevadas taxas de mortalidade infantil

(FREITAS et al., 2001). Além disso, o contato primário através de banhos e natação pode provocar otites, infecções cutâneas, oculares, nasais e de garganta (VASCONCELOS; AQUINO, 1995).

Anualmente, morrem no Brasil, vinte mil crianças menores de cinco anos devido à diarreias, vômitos e desnutrição causada pelo consumo de água contaminada. O número de vítimas de doenças de veiculação hídrica deve-se principalmente, à falta de saneamento básico, em 54,0% das residências do país (SILVA; SALGUEIRO, 2001).

Em relação à água mineral envasada, seu consumo tornou-se popular a partir da década de 80, em função da crescente preocupação da população com a saúde, decorrente da progressiva poluição das águas (COELHO et al., 1998). A razão desta popularidade reside, em parte, nas propriedades medicinais e terapêuticas atribuídas à água, mas fundamentalmente, no conceito de elevada pureza associado ao produto (EIROA et al., 1996).

Tradicionalmente, águas minerais eram aquelas que emergiam naturalmente de fontes subterrâneas, sendo consumidas no lugar de origem. Existem também as águas minerais “artificiais” ou “manufaturadas” que são preparadas pela adição de minerais apropriados em água potável. Conseqüentemente, foi necessária a introdução do termo água mineral “natural” para distinguir a água de nascentes subterrâneas das águas manufaturadas (CABRINI; GALLO, 2001).

O controle de qualidade de água destinada ao consumo humano, desde os sistemas produtores (mananciais, captação e tratamento) aos sistemas de distribuição (reservatórios, redes), normalmente é realizado pela empresa de saneamento local e monitorada pelas Secretarias de Saúde Estaduais. Este monitoramento - estabelecido pela Portaria n.º 518 do Ministério da Saúde institui

números mínimos de amostras ou planos de amostragem, além dos padrões para água potável restritos ao trecho que se inicia na captação e se encerra nas ligações domiciliares dos consumidores (BRASIL, 2004).

2.2 Contaminação da água

A água é considerada um componente vital no sistema de sustentação da vida na terra e por isso deve ser preservada, mas nem sempre isso acontece. A sua poluição impede a sobrevivência da vida vegetal e animal, causando também graves conseqüências aos seres humanos (CARMOUZE, 1994).

A poluição da água indica que um ou mais de seus usos foram prejudicados, podendo atingir o homem de forma direta, pois ela é usada por este para ser bebida, para tomar banho, para lavar roupas e utensílios e, principalmente, para sua alimentação e dos animais domésticos. Além disso, abastece nossas cidades, sendo também utilizada nas indústrias e na irrigação de plantações. Por isso, a água deve ter aspecto límpido, ser insípida, inodora e isenta de microrganismos patogênicos, o que é conseguido através do seu tratamento, desde a retirada dos rios até a chegada nas residências urbanas ou rurais (BRANCO, 1986).

A água de um rio é considerada de boa qualidade quando apresenta menos de mil coliformes fecais, e menos de dez microrganismos patogênicos por litro. Portanto, para a água se manter nessas condições, deve-se evitar sua contaminação por resíduos agropecuários, esgotos domésticos, resíduos industriais, lixo ou sedimentos vindos da erosão (BRANCO, 1986).

As populações urbanas e rurais, bem como as indústrias e atividades

agropecuárias, geram resíduos sólidos, líquidos e gasosos com potencial de poluição/contaminação ambiental elevado, quando não tratados e/ ou dispostos de forma adequada. Os resíduos industriais devem passar por processos de tratamentos específicos, adequados aos compostos presentes, principalmente nos seus efluentes líquidos e resíduos industriais (BRANCO, 1986).

Nas cidades, os sistemas de esgotos sanitários devem tratar os resíduos líquidos de forma adequada, antes de serem lançados aos rios, reduzindo os níveis de contaminação devendo ocorrer o mesmo, nas áreas rurais. Os resíduos sólidos não aproveitáveis e que serão dispostos no solo, devem receber atenção especial pois geram um líquido altamente perigoso chamado “chorume” que pode contaminar águas subterrâneas e superficiais. A disposição inadequada do lixo faz com que este seja carregado pelas águas de chuva e levado, na forma de percolato, aos rios, trazendo problemas de poluição e obstrução de vias de escoamento e provocando enchentes (ESTEVES, 1988).

Chorume ou primeiro é o líquido oriundo da decomposição de resíduos orgânicos e provém de três fontes: i) umidade natural do lixo, ii) água de constituição dos vários materiais que sobem durante a decomposição e iii) líquidos provenientes da dissolução da matéria orgânica por enzimas produzidas por bactérias. Esses microrganismos, em seu processo metabólico, secretam enzimas que dissolvem a matéria orgânica, possibilitando a absorção dos constituintes alimentares através de suas membranas. O excesso escorre como líquido escuro, característico de resíduos orgânicos de decomposição (LUZ, 1981).

Percolados (líquidos percolados) são as águas pluviais não desviadas da área de aterros, infiltrações de lagoas vizinhas ou do próprio lençol freático e nascente

não detectado na ocasião de escolha do local, cuja vazão se intensifica nos períodos de chuvas prolongadas. Depois de atingido o ponto de saturação da massa disposta no aterro, essas águas escorrem arrastando o chorume e outros elementos prejudiciais tanto para o lençol subterrâneo como para cursos de águas próximos (LUZ, 1981).

A agroindústria contribui para a poluição/contaminação das águas com resíduos orgânicos gerados e não tratados e produtos químicos utilizados (defensivos, adubos) cujos resíduos infiltram-se no solo ou são carreados pela chuva para mananciais de superfície (ESTEVES, 1988).

Estes resíduos poluentes tornam-se geradores de nutrientes propiciando um crescimento excessivo de bactérias decompositoras que consomem oxigênio, diminuindo a concentração deste na água. Isso afeta outras formas de vida animal e vegetal, que utilizam o oxigênio na respiração, além das bactérias aeróbicas, que são impedidas de decompor a matéria orgânica, sem deixar odores nocivos, através do consumo de oxigênio (ESTEVES, 1988).

Pode-se dizer que nos países ricos, a poluição das águas é resultado da maneira como a sociedade consumista está organizada para produzir e desfrutar da riqueza, progresso material e bem-estar. Já nos países pobres, a poluição é resultado da pobreza e da ausência de educação de seus habitantes, que, assim, não têm base para exigir os seus direitos de cidadãos, o que só tende a prejudicá-los, pois esta omissão na reivindicação de seus direitos leva à impunidade. As indústrias poluem cada vez mais e os governantes, também se aproveitam da ausência da educação do povo e ignoram a questão como se a poluição não atingisse a eles (BRANCO, 1986).

Os rios possuem, normalmente, diversos tipos de bactérias. Estas são importantes porque, consumindo matérias orgânicas, absorvem a carga poluidora que é lançada, sendo as principais responsáveis pela autodepuração, ou seja, limpeza do rio. Quando os rios recebem esgotos, passam a conter outros tipos de bactérias que podem causar doenças às pessoas que utilizarem essa água. Um grupo importante, que pode estar presente nestas águas, é o das bactérias coliformes (CARMOUZE, 1994).

As bactérias do grupo coliforme também são encontradas no solo e em vegetais, algumas apresentando capacidade de se multiplicar na água com altos teores de nutrientes. Outras, não se multiplicam com facilidade no ambiente externo, sendo pouco resistentes na água e, comprovadamente, de origem fecal, portanto denominadas de "coliformes fecais". A presença de coliformes fecais na água indica a possível presença de patógenos neste substrato, como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae* e *Shigella sp.*, além de vírus (hepatite, poliomielite e gastroenterites) e protozoários como *Entamoeba sp* e *Giardia sp* (PELCZAR Jr. et al., 1997).

A presença de bactérias coliformes fecais na água significa que este recebeu matérias fecais ou de esgotos uma vez que estes microrganismos estão presentes no trato gastrointestinal do homem e dos animais de sangue quente. Assim, se a água recebe fezes, pode estar recebendo microrganismos patogênicos carregados por fezes de pessoas doentes. Portanto, a detecção de coliformes em águas indica contaminação desta por fezes e a possível presença de patógenos (CARMOUZE, 1994; KRAMER et al., 1994).

2.3 Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores vêm sendo utilizados na avaliação da qualidade microbiológica da água há muito tempo. São grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal e também sobre a provável presença de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

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 (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo o International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF, 1978), os microrganismos indicadores podem ser agrupados em:

1. Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras.

2. Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli*.

O indicador ideal de contaminação fecal, portanto, deve preencher outros requisitos além dos anteriormente citados: i) ter como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais; ii) ocorrer em número elevado nas fezes; iii) apresentar alta resistência ao ambiente extra-enteral; iv) ser detectado através de técnicas rápidas, simples e precisas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

2.3.1 Coliformes totais (C.T.)

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. São bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos (RAY, 1996).

Pertencem a este grupo predominantemente, bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destas, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais - *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* – além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

2.3.2 Coliformes fecais (C.F.) e *Escherichia coli*

As bactérias pertencentes a este grupo correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44,5-45,5°C. Nessas condições, ao redor de 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).

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal do homem e de animais. Esse microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bastonetes Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar lactose com produção de gás (SILVA et al., 2000).

O grupo coliforme possui um subgrupo de bactérias denominadas coliformes termotolerantes, que, são capazes de fermentar a lactose a 44- 45°C ($\pm 0,2$) em 24 horas (Brasil, 2005).

Pertence, a este subgrupo, o gênero *Escherichia* e, em menor extensão, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*; tendo como principal representante a *Escherichia coli* (bactéria de origem exclusivamente fecal). Os coliformes termotolerantes distintos de *E. coli*, podem originar-se de águas enriquecidas organicamente como, por exemplo, de efluentes industriais ou de materiais vegetais e solo em decomposição. Por esta razão, o termo mais apropriado é termotolerantes e não coliformes fecais (WHO, 1996).

A pesquisa de coliformes fecais ou de *Escherichia coli* fornece com maior segurança, informações sobre as condições higiênica da água e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (RAY, 1996).

2.4 Métodos de análise microbiológica de água

A análise microbiológica da água pode ser conduzida para investigar a presença ou a ausência de microrganismos neste produto, para quantificar os microrganismos presentes e para identificar e caracterizar as diferentes espécies microbianas. Inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados em cada uma dessas determinações. Atualmente, esses métodos são comumente divididos em métodos “convencionais” e métodos “rápidos” (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

2.4.1 Métodos convencionais

Os métodos convencionais recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos e desde então vêm sendo empregados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios brasileiros e também em outros países. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitas. Segundo Franco e Landgraf, (2003) entre essas publicações destacam-se o *Bacteriological Analytical Manual* (1992) publicado em conjunto pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) e *Association of*

Official Analytical Chemists International (1992), o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, inicialmente editado pela *American Public Health Association* (APHA) e na edição mais recente por Vanderzant e Splittstoesser (1992), e o *Microorganisms in foods- their significance and methods of enumeration* (1978), publicado pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF).

Os métodos convencionais para caracterização de um determinado microrganismo são baseados na observação da capacidade deste microrganismo de realizar determinadas reações bioquímicas. Em geral, estas reações são realizadas em tubos de ensaio e podem representar uma quantidade de trabalho muito grande a um custo bastante elevado (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O método para a determinação de coliformes totais e fecais pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, bem como a Técnica de Filtração em Membrana, apesar de seletivos para a determinação do grupo coliforme, não indicam uma separação específica das várias espécies de origem fecal do grupo coliforme (COVERT et al., 1989; KATAMAY, 1990).

2.4.1.1 Determinação de C.T. e C.F. pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos

A Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM), também conhecida como Método do Número mais Provável, é uma maneira bastante utilizada para estimar alguns tipos de microrganismos, como coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e até mesmo *S. aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Nesta técnica, após homogeneização, alíquotas e ou diluições do produto a ser analisado são transferidas para tubos de ensaios contendo o meio de cultura apropriado e um tubo coletor de gás (tubo de Durhan). Todos os tubos são incubados, e, em seguida, os positivos são identificados. No caso de coliformes totais e fecais, positividade significa turvação do meio com produção de gás. Pelo número de tubos positivos em cada uma das diluições empregadas, determina-se o número mais provável (NMP), tendo como base tabelas estatísticas (Tabela de Hoskins) (Anexo A) (APHA, 1998).

2.4.1.2 Determinação de C.T. e C.F. pela técnica da Membrana Filtrante

A técnica de membrana filtrante é um método alternativo de quantificação de microrganismos. O produto em análise é homogeneizado e filtrado através de membranas filtrantes de acetato de celulose ou nitrocelulose, de porosidade adequada (geralmente de $0,45\mu\text{m}$), que permite a passagem de líquidos retendo os microrganismos com dimensões maiores que o tamanho do poro (Figuras 1a e 1b).



Figura 1a- Unidades Filtrantes para filtração a vácuo (150mL a 1L)

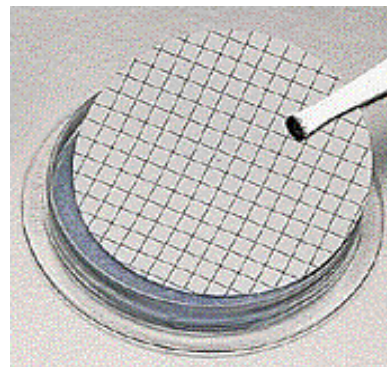


Figura 1b- Membrana Filtrante

Após a filtração e retenção dos microrganismos, a membrana é transferida para a superfície das placas de Petri contendo o meio de cultura de escolha. Após a incubação as colônias são enumeradas, visualmente ou através de contadores eletrônicos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

2.4.2 Métodos rápidos

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para obtenção dos resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial. Além desses objetivos, esses métodos visam também a simplificação do trabalho e a redução dos custos. Para alguns métodos, a essas vantagens aliam-se outras como maior sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A partir de 1992, a *American Public Health Association* publicou no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* a Técnica de Substratos Definidos (TSD) para utilização na determinação da qualidade bacteriológica de águas para consumo humano, e a sua aprovação e padronização encontram-se na 20^a edição (APHA, 1998).

Diversas técnicas baseadas em substratos enzimáticos fluorogênicos e/ou cromogênicos, têm sido desenvolvidas e envolvem a capacidade de detectar a presença de enzimas específicas com o emprego de substratos apropriados. A incorporação de tais substratos permite a detecção, enumeração e identificação de forma direta em placa de isolamento ou em caldo, evitando o uso de

subculturas e testes bioquímicos para estabelecer a identificação de certos microrganismos (MANAFI, 1995, 1996, MANAFI; ROSMANN, 1998; MANAFI, 2000).

Como *Escherichia coli* e coliformes são os mais importantes indicadores da poluição de águas, algumas técnicas são capazes de detectar rapidamente, estes microrganismos, através da adição de substratos enzimáticos para a detecção de β -D-galactosidase, que indica a presença de coliformes totais, e de β -D-glucoronidase, que indica a presença de *E. coli* (SILVA et al., 2000).

O uso das Técnicas dos Substratos Cromogênicos (Definidos) permite determinar simultaneamente coliformes totais, coliformes fecais presentes em amostras de água, utilizando apenas um meio de cultura. O tempo necessário para obtenção dos resultados confirmados varia entre 18 e 28 horas, dependendo do produto comercial utilizado, representando grande vantagem pela rapidez do resultado e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento público (IDEXX, 2005).

2.4.2.1 Tecnologia do substrato enzimático Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) – Colilert[®] (Iidexx), Colilert 18[®](Iidexx) e Coliquick[®] (Hach)

A detecção e identificação dos coliformes totais e de *Escherichia coli* pela Técnica do Substrato Cromogênico Enzimático Colilert[®] (Iidexx) e Coliquick[®] (Hach) é fundamentada no substrato orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), que é hidrolizado a orto-nitrofenol através da ação da enzima β -galactosidase produzida pelos coliformes totais (Figura 2).

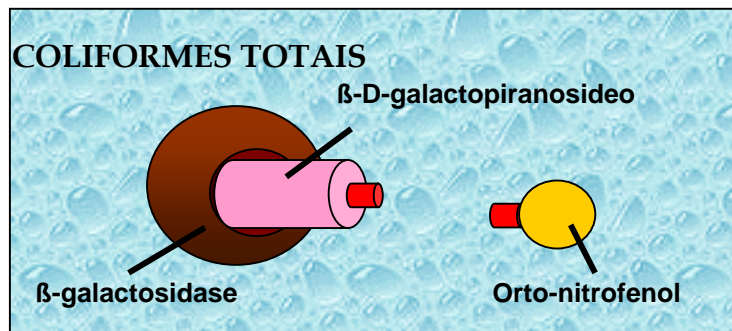
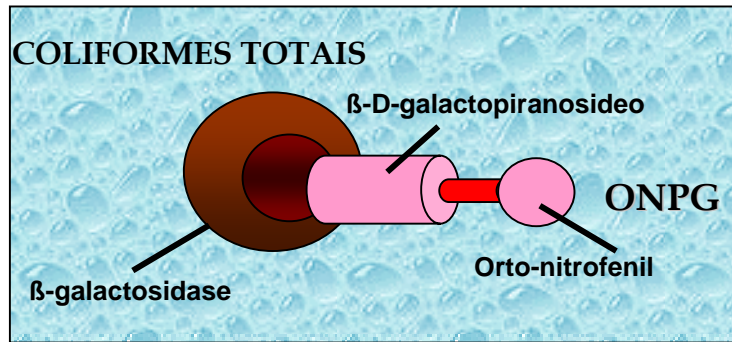


Figura 2 – Esquema da reação enzimática do substrato ONPG (IDEXX, 2005)

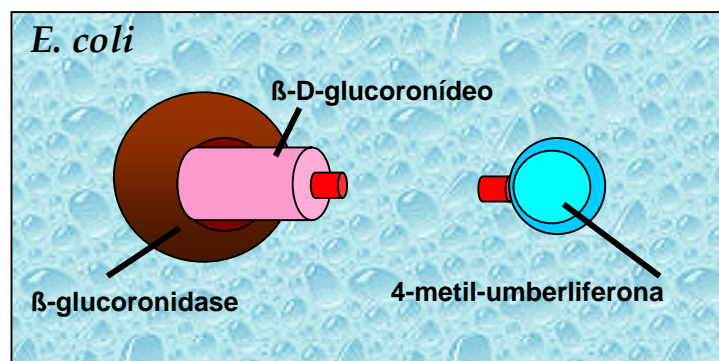
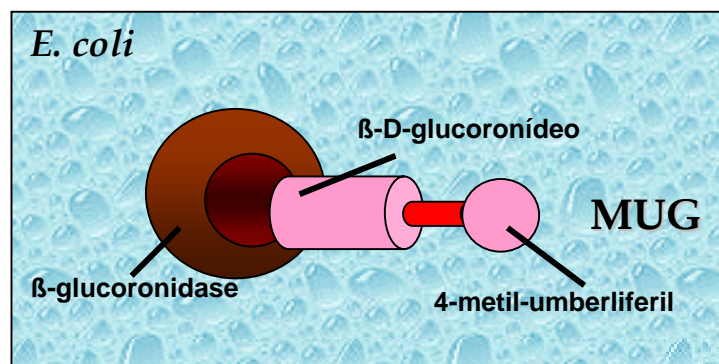


Figura 3 – Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005)

A constatação da presença de *Escherichia coli* é obtida através da ação da enzima β -glucuronidase, que é caracteristicamente produzida pela *Escherichia coli*, sobre o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG); quando o MUG é degradado, o produto resultante 4-metilumbeliferona (Figura 3) apresenta fluorescência azul sob luz ultravioleta (360nm) (Figura 4) (COVERT et al., 1989 ; SILVA et al., 2000).

Nesta técnica, a presença de coliformes totais é confirmada pela alteração da coloração do meio, de incolor para amarelo (Figura 4).



Figura 4 – Mudança de coloração na reação enzimática ONPG/ MUG (IDEXX, 2005)

Incolor = negativo (ausência coliforme)

Amarelos = coliformes totais

Fluorescência= *E. coli*

2.4.2.2 Tecnologia do substrato enzimático vermelho de clorofenil- β -D-galactopiranosídeo (CPRG)- Colisure[®] (Iidexx)

Na técnica Colisure[®] (Iidexx), os coliformes totais hidrolisam o substrato vermelho de clorofenil- β -galactopiranosídeo (CPRG), transformando-o em vermelho de clorofenol (Figura 6). A presença de coliformes totais é confirmada pela alteração na coloração do meio, de amarelo para vermelho (Figura 5) (APHA, 1998).

A presença de *Escherichia coli* é detectada pela fluorescência azul do meio sob luz ultravioleta (360nm) (Figura 5); isto se deve à ação da enzima β -glucoronidase sobre o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG), que quando este é degradado o produto resultante é a 4-metilumbeliferona (Figura 7) (APHA, 1998).



Figura 5 – Mudança de coloração na reação enzimática CPRG/MUG (IDEXX, 2005)

Amarelo = negativo

Magenta = coliformes totais

Fluorescência = *E. coli*

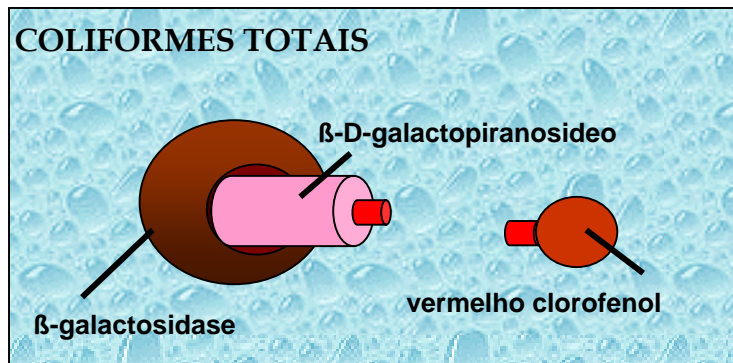
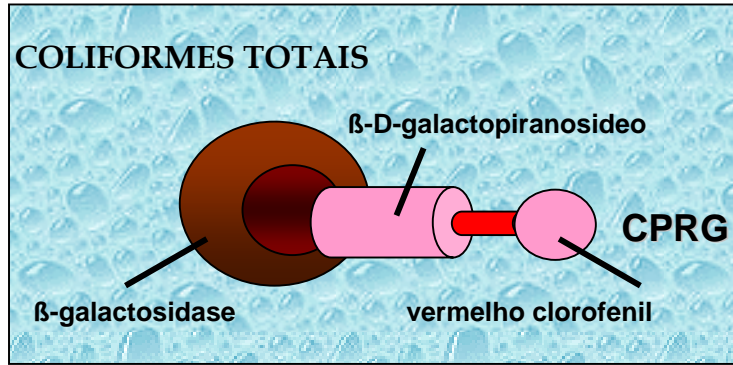


Figura 6 – Esquema da reação enzimática do substrato CPRG (IDEXX,2005)

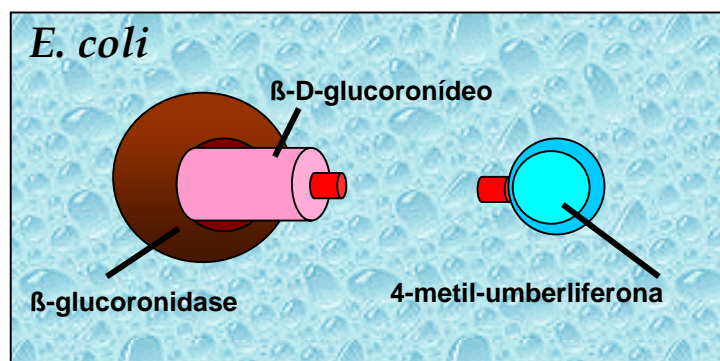
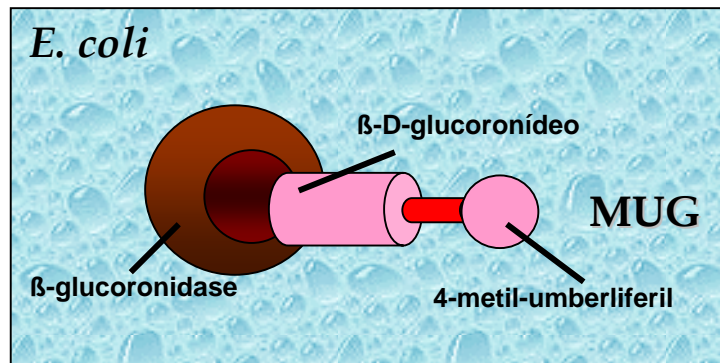


Figura 7 – Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005)

2.4.2.3 Tecnologia do substrato enzimático 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL)- Fluorocult LMX[®] (Merck) ou Readycult Coliformes[®] (Merck)

Outro método rápido utilizado para a detecção e identificação dos coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* é o produto denominado Readycult Coliformes[®] (Merck) que apresenta em sua composição 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL), substrato cromogênico para a enzima β -galactosidase, produzida pelos coliformes totais hidrolizando-o em bromo-cloro-indigo (Figura 8).

Nesta técnica a presença de coliformes totais é confirmada pela alteração na coloração do meio, de levemente amarelo para azul esverdeado (Figura 10).

A presença de *Escherichia coli* é detectada pela observação de fluorescência azul, sob luz ultravioleta (360nm); isto se deve à ação da enzima β -glucuronidase sobre o substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG); o produto resultante 4-metilumbeliferona é fluorescente sob luz ultravioleta (Figura 9). Para confirmar a presença de *Escherichia coli* deve ser adicionado 2,5mL do reativo de Kovac's aos tubos; a formação de um anel vermelho indica prova de indol positiva confirmando a presença de *E. coli* (Figura 10)(MERCK, 2003).

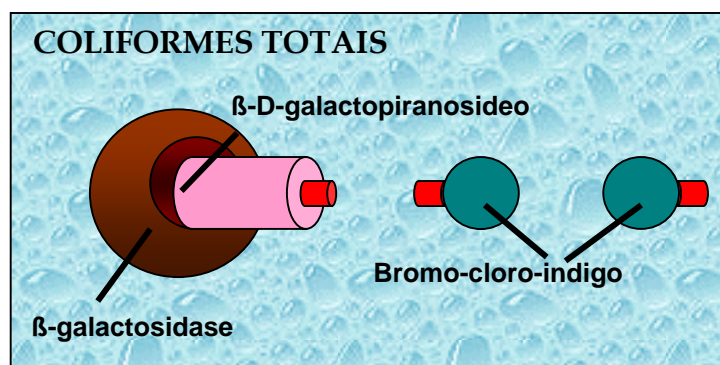
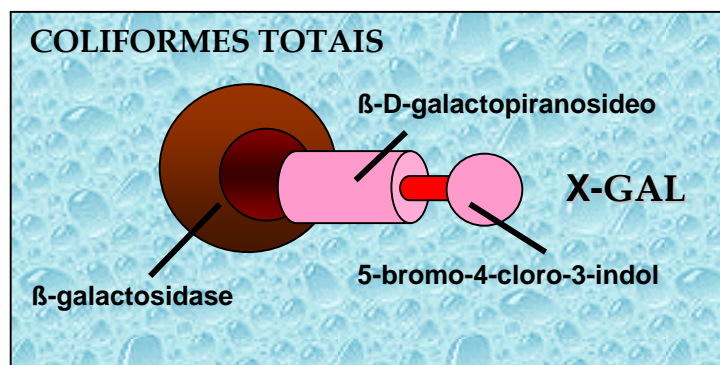


Figura 8– Esquema da reação enzimática do substrato X-GAL

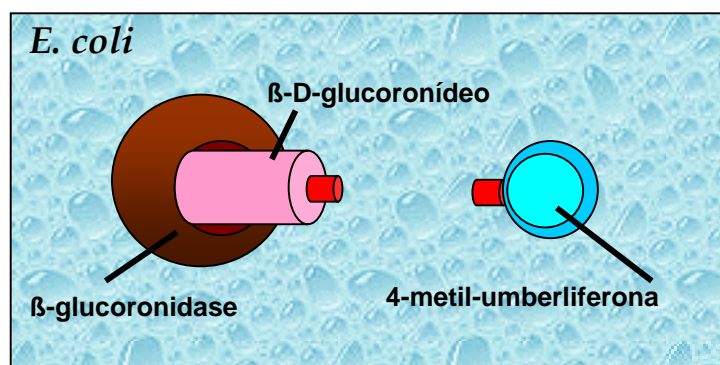
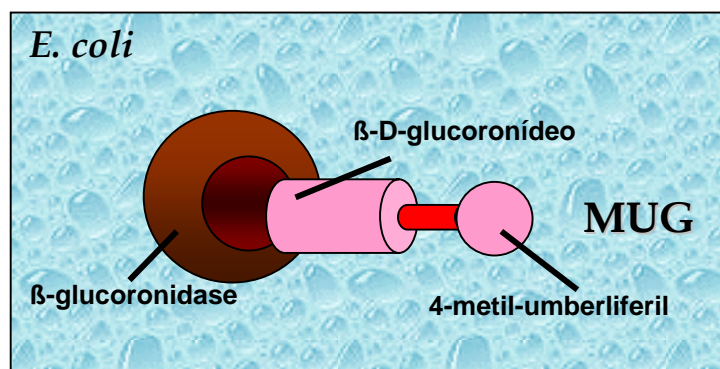


Figura 9 – Esquema da reação enzimática do substrato MUG (IDEXX, 2005)



Figura 10 – Mudança de coloração na reação enzimática X-GAL/MUG (MERCK, 2005)

Levemente amarelo = negativo

Verde azulado= coliforme totais

Fluorescência = Coliformes fecais

Verde azulado + Fluorescência + Anel de indol = *E. coli*

2.4.2.4 Tecnologia do Substrato Definido (TSD) em cartela ou empregando a Técnica de Tubos Múltiplos

Para determinação de coliformes totais e *E. coli* empregando as técnicas dos substratos enzimáticos descritas anteriormente, pode-se utilizar também a Técnica de Tubos Múltiplos (Figura 11) ou a determinação em cartelas empregando-se Colilert[®] (Idexx), Colilert[®] 18 (Idexx), Colisure[®] (Idexx) e o Coliquick[®] (Hach)



Figura 11– Tecnologia do substrato cromogênico ONPG empregando a Técnica de Tubos Múltiplos

Para estas determinações pode-se utilizar os sistemas Quanti-tray[®] (Idexx) e Quanti-tray[®]/2000 (Idexx) que são compostos por flaconetes com meios de cultura e cartelas estéreis com 50 e 96 cavidades, respectivamente. O Quanti-tray[®](Idexx) (Figuras 12a, 13a e 14a) permite determinar NMP de 1 a 200 coliformes por 100mL e o Quanti-tray[®]/2000 (Idexx) (Figuras 12b, 13b e 14b) determina NMP de 1 a 2.419 coliformes por 100mL. Os resultados de coliformes totais e *Escherichia coli* são obtidos simultaneamente, consultando a Tabelas apropriadas (Tabelas de Hoskins-Anexos A e B) para se determinar o NMP de Coliformes totais e *E. coli*.

Esta técnica quando comparado à Técnica convencional de Fermentação em Tubos Múltiplos amplia o número de combinações positivas possíveis, fornecendo resultados mais precisos (COELHO et al., 1998).

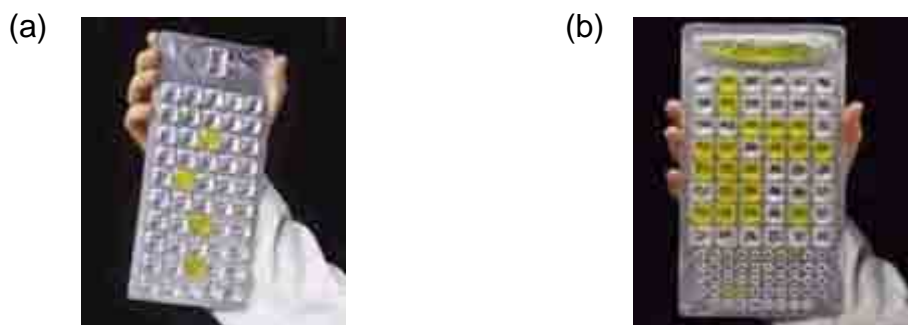


Figura 12 – Quanti-Tray[®](Idexx) (a) e Quanti-Tray[®]/2000(Idexx) (b) ilustrando a mudança de coloração quando o substrato ONPG é degradado (coloração amarela) (IDEXX, 2005).

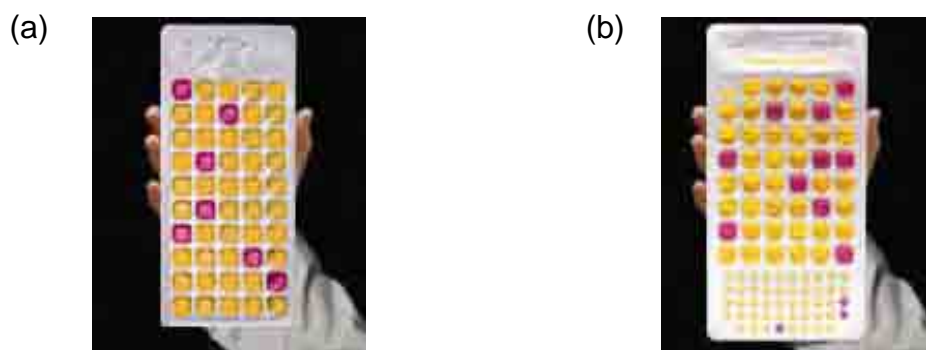


Figura 13 – Quanti-Tray[®](Idexx) (a) e Quanti-Tray[®]/2000(Idexx) (b) ilustrando a mudança de coloração quando o substrato CPRG é degradado (coloração magenta) (IDEXX, 2005).

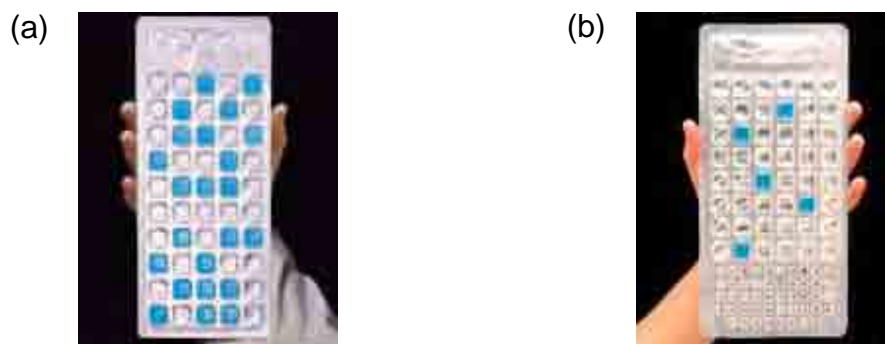


Figura 14 – Quanti-Tray[®](Idexx) (a) e Quanti-Tray[®]/2000(Idexx) (b) ilustrando a fluorescência azul quando o substrato MUG é degradado (IDEXX, 2005).

2.4.3 Outros estudos realizados utilizando a Tecnologia dos Substratos Definidos

Devido à existência de diversos Sistemas de Substratos Enzimáticos Cromogênicos disponíveis comercialmente para a detecção de coliformes totais e

E. coli em águas, várias pesquisas têm sido realizadas visando testar a eficiência dos mesmos na avaliação da qualidade microbiológica de águas de diferentes origens. Os resultados, comparados com outros métodos tradicionais como a Técnica da Membrana Filtrante e a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, mostraram excelente correlação para alguns produtos e fraca para outros (COVERT et al., 1989; CLARK et al., 1993; PELLIZARI et al., 1993; MANAFI, 1995, 1996; MANAFI; ROSMANN, 1998; MANAFI, 2000).

Em alguns estudos realizados com água não tratada, não foram observadas diferenças significativas para a detecção de *E. coli* quando foram comparadas as técnicas Colilert®(Idexx) com a Técnica de Filtração em Membrana, ou com a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (EDBERG et al., 1990; COWBURN et al., 1994; FRICKER e FRICKER, 1996).

PALMER et al. (1993) avaliaram a recuperação de *E. coli* em amostras de água do mar comparando as técnicas Colilert®(Idexx) e a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos e não observaram diferença significativa entre as duas técnicas testadas.

FRICKER et al. (1997) compararam a eficiência da técnica Colilert®/18(Quanti-Tray®/Idexx) e Colilert® (Quanti-Tray®/Idexx) com a Técnica da Membrana Filtrante na recuperação de *E. coli*, em amostras de água, artificialmente contaminadas com microrganismo e concluíram não haver diferença significativa na detecção de coliformes totais e *E. coli* quando essas técnicas foram empregadas para monitorar a qualidade bacteriológica da água.

ECKNER (1998) realizou um estudo comparativo empregando as Técnicas de Fermentação em Tubos Múltiplos, Técnica da Membrana Filtrante, e a técnica Colilert®(Idexx), e analisou 261 amostras de água potável e 77 amostras de águas

de recreação para enumeração de coliformes e *E. coli*, concluindo que a técnica Colilert®(Idexx) apresentou a mesma sensibilidade que os métodos convencionais empregados.

ALVES et al. (2002) utilizaram a técnica do Colilert® em cartela (Quanti-Tray®/Idexx) para avaliar a qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento público da cidade de Marília e observaram a sensibilidade da técnica na detecção de coliformes totais e fecais nos dois tipos de água.

KRAMER et al. (2002) compararam a eficiência da técnica Colilert®(Quanti-Tray®/Idexx) com as Técnicas de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) para enumeração de coliformes totais e coliformes fecais em lodo de esgoto ativado. Os resultados mostraram que o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais enumerados pela TFTM foi estatisticamente mais elevado que a quantificação de *Escherichia coli* pela técnica Quanti-Tray®(Idexx); por outro lado observaram que o NMP de *E. coli* foi semelhante em ambas as técnicas. Os autores concluíram que devido à facilidade de uso e a redução de tempo de análise o sistema Quanti-Tray®(Idexx) pode ser bastante útil para enumeração *E. coli*, em lodo de esgoto ativado.

SCHETS et al. (2002) realizaram um estudo comparativo entre as técnicas Colilert®18 (Idexx), plaqueamento em Ágar Chromocult Coliforme e plaqueamento em um meio específico para *E. coli* visando quantificar coliforme total e *E. coli* em água de abastecimento público e observaram que o sistema Colilert®18(Idexx) apesar de ser um bom método alternativo apresentou contagens de coliformes totais mais elevadas e contagens de *E. coli* menores, quando comparado com os outros métodos.

YAKUB et al. (2002) realizaram em estudo comparativo entre as técnicas Colilert®(Idexx), Enterolert (Idexx) e a técnica convencional de Filtração em Membrana para enumeração de bactérias indicadoras em águas de superfície e efluente de esgoto tratado e observaram que a sensibilidade da Tecnologia de Substratos Definidos foi igual ou superior à técnica tradicional para a detecção dos microrganismos citados.

CHAO et al. (2003) compararam a eficiência da técnica Colilert®(Quanti-Tray® 2000/Idexx) com o método tradicional de Filtração em Membrana para enumeração de coliformes totais e *E. coli*, em 125 amostras de água de rios, nascentes ou poços e observaram que a determinação dos microrganismos coliformes totais e *E. coli* foi semelhante em ambos os métodos utilizados.

NIEMELA et al. (2003) descreveram um estudo envolvendo, 20 laboratórios de 13 países europeus visando comparar a eficiência da técnica Colilert®(Quanti-Tray® 2000/Idexx) com a técnica convencional da Membrana Filtrante, que é a técnica recomendada nos países europeus. Os resultados deste estudo mostraram que a tecnologia de substrato definido detectou contagens significativamente, mais elevadas de coliformes e *E. coli* quando comparado com a técnica padrão, o que revelou menor eficiência da técnica da Membrana Filtrante em detectar a presença destes microrganismos em águas potáveis.

BUBERT et al. (2003) realizaram um estudo comparativo entre a técnica Colilert® (Idexx) e Readycult Coliformes® (Merck) visando a detecção de *E. coli* O157:H7 em amostras de água artificialmente contaminadas com o microrganismo e observaram que nenhuma destas técnicas foi capaz de detectá-lo.

ECCLES et al. (2004) realizaram um estudo comparativo utilizando a Técnica da Membrana Filtrante e a técnica Colilert®(Quanti-Tray® 2000/Idexx) para o

isolamento e enumeração de *E. coli* em lodo de esgoto tratado e não observaram uma variação considerável no índice de recuperação do microrganismo, em qualquer das técnicas estudadas.

3 OBJETIVOS

- Realizar avaliação comparativa da eficiência das técnicas Técnica do Substrato Definido Colilert (TSD-C) e Substrato Definido Readyult (TSD-R) com (TFTM),
- Determinar coliformes totais, coliformes fecais/*Escherichia coli*, em amostras de água de diversas origens (rios, córregos, riachos, represas, lagos, poços, nascentes e sistemas de abastecimento público), recebidas pelo Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Unesp- Araraquara, usando métodos rápidos e Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos em amostras de água,
- Utilizar análise estatística para comparar a eficiência e a especificidade das técnicas utilizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A amostragem foi composta de diversos tipos de águas tratadas e não tratadas, para a avaliação de diferentes níveis de contaminação. As amostras foram agrupadas da seguinte forma:

1. Águas de sistemas de abastecimento público (tratada)
2. Águas de superfície (rios, córregos, riachos, represas e lagos)
3. Águas subterrâneas (poços rasos, nascentes e poços profundos)

Foram coletadas 73 amostras, nos diferentes grupos analisados, com volume de 500mL cada, perfazendo um total de 219 amostras analisadas, no período de dezembro de 2002 a junho de 2003.

4.2 Coleta das amostras

Para as amostras de água de abastecimento público procedia-se a desinfecção das torneiras com álcool, 70% a fim de minimizar a contaminação bacteriológica da amostra. Após este procedimento deixava-se a água escoar, em pressão máxima por 4 minutos que era em seguida reduzida para meio fio e procedia-se à coleta da amostra (CETESB,1998). Os frascos continham, 0,5mL de tiosulfato de sódio a 1,8% para neutralizar o cloro residual presente nas amostras de água.

Para as amostras de água de superfície recolhia-se a amostra com a boca do frasco posicionada contra a corrente, sendo, o mesmo aberto somente, no momento da coleta e imediatamente, fechado. Quando não era possível coletar a amostra desta forma, amarrava-se o frasco com barbante para lançá-lo ao leito do rio.

Para as amostras de água subterrânea procedeu-se à coleta na torneira, ou seja, na primeira saída do poço, desinfetando a torneira com álcool 70%, a fim de minimizar a contaminação bacteriológica da amostra. Após este procedimento deixava-se a água escoar, em pressão máxima, por 4 minutos que era em seguida reduzida para meio fio para se proceder a coleta (CETESB,1998).

As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas ao laboratório e mantidos sob refrigeração até o início das análises em período não superior a vinte e quatro horas (APHA, 1998).

4.3 Análises microbiológicas

As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia descrita por (APHA, 1998).

Após a homogeneização adequada da amostra, (inversão do frasco 25 vezes, em arco de 30 cm), foram retiradas três porções de 100mL, que foram analisadas pelo método do NMP para as seguintes técnicas: Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM), Técnica do Substrato Definido Colilert[®] (Idexx) (TSD-C) e a Técnica de Substrato Definido Readycult Coliformes[®] (Merck) (TSD-R), conforme o esquema a seguir:

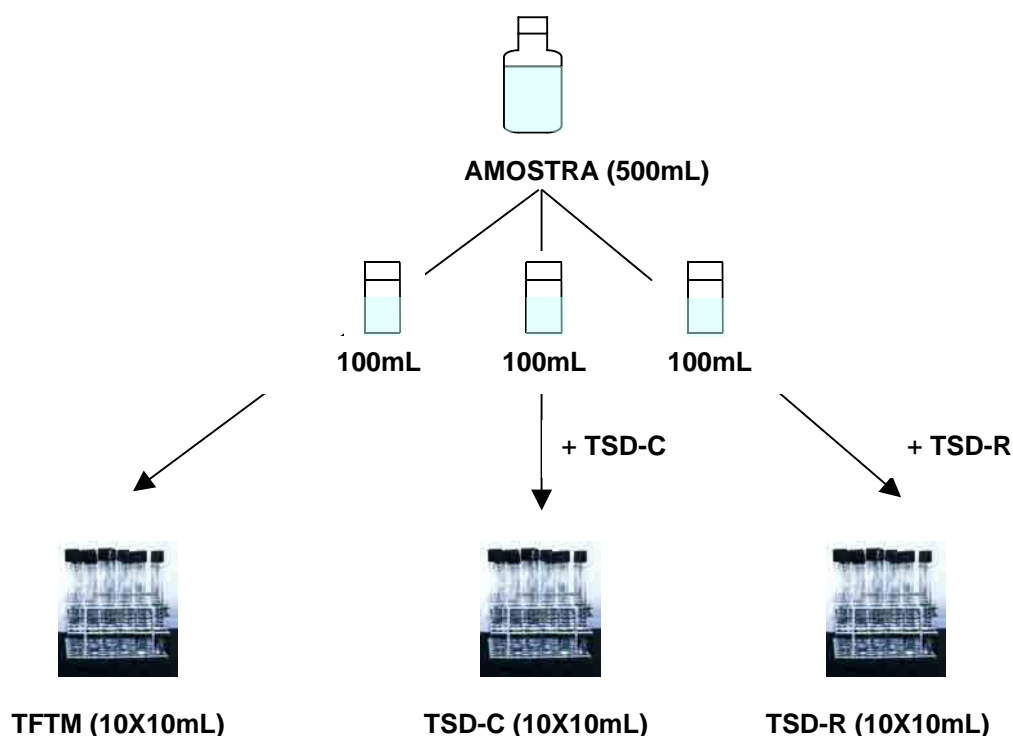


Figura 15- Esquema de análise para determinação de coliformes totais e coliformes fecais pela Técnica em Tubos Múltiplos (SILVA, 2000).

4.3.1 Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliforme fecais

Na estimativa do número de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em amostras de água para determinação do NMP pela Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, transferiu-se 10 porções de 10mL da amostra para tubos contendo 10mL de caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST), em concentração dupla com tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35-37°C por 24-48h.

A partir dos tubos de LST com produção de gás e turvação (prova presuntiva positiva) transferiu-se, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, porções de cultura para os tubos contendo 7 a 10mL de Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) com tubos de Durham invertidos. Estes foram incubados a 35-37°C por 24-

48h, sendo turvação e produção de gás a prova confirmatória positiva para coliformes totais.

A partir dos tubos de caldo LST com resultados positivos transferiu-se uma alçada para os tubos contendo 7 a 10mL de caldo EC com tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram incubados em banho-maria a 44,5°C durante 24h ± 2h, sendo a turvação e a produção de gás a prova considerada positiva para coliformes fecais.

Foi calculado o número mais provável de coliformes (NMP/100mL) empregando-se tabela apropriada (Tabela 1- Anexo A).

4.3.2 Técnica do Substrato Definido utilizando o substrato Colilert® (Idexx) (TSD-C) para determinação de coliformes totais e coliformes fecais/*E. coli*

Ao frasco contendo 100mL da amostra de água, verteu-se em condições assépticas, o conteúdo de um flaconete contendo o substrato do TSD-C. O frasco foi fechado e agitou-se vigorosamente, até que todos os grânulos fossem dissolvidos. Com auxílio de pipeta estéril, transferiu-se 10mL da amostra de água com substrato para cada um dos 10 tubos de ensaio estéreis, que foram incubados a 35-37°C por 24 h.

O aparecimento de coloração amarelada nos tubos, indicou positividade para coliformes totais. Foi calculado o número mais provável de coliformes (NMP/100mL) empregando-se Tabela apropriada (Tabela 1- Anexo A).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais, os tubos foram expostos à luz ultravioleta (360nm de comprimento de onda) para a

verificação de fluorescência azul, o que indica positividade para coliformes fecais, especificamente *E. coli*.

Foi calculado o número mais provável de coliformes fecais/ *E. coli* (NMP/100mL) empregando-se Tabela apropriada (Tabela 1- Anexo A).

4.3.3 Técnica dos Substratos Definidos utilizando o substrato Readycult Coliformes[®] (Merck) (TSD-R) para determinação de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli*.

Ao frasco contendo 100mL da amostra de água, verteu-se em condições assépticas, o conteúdo de um flaconete contendo o substrato da TSD-R. O frasco foi fechado e agitou-se vigorosamente até que todos os grânulos fossem dissolvidos. Com auxílio de pipeta estéril, transferiu-se 10mL da amostra de água com substrato, para 10 tubos de ensaio estéreis, que foram incubados a 35-37⁰C por 24 h.

O aparecimento de coloração verde-azulada nos tubos indicou positividade para coliformes totais. Foi calculado o número mais provável de coliformes (NMP/100mL) empregando-se Tabela apropriada (Tabela 1- Anexo A).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais, os tubos acima descritos foram expostos à luz ultravioleta (360nm de comprimento de onda) para a verificação de fluorescência azul, o que indica positividade para coliformes fecais, especificamente *E. coli*.

A presença de *E. coli* foi confirmada adicionando-se, 0,25 a 0,3mL do reativo de Kovac's em cada tubo; a formação de um anel vermelho indicou prova de indol

positiva e confirmou a presença de *E. coli*. Foi calculado o número mais provável de *E. coli* (NMP/100mL) empregando-se Tabela apropriada (Tabela 1- Anexo A).

Segundo o fabricante, a TSD-R é recomendada para uso em determinações qualitativas (presença/ausência), não havendo recomendação para o uso em determinações quantitativas.

4.4 Análise Estatística

Para estimar o grau de concordância entre as técnicas utilizadas foram empregadas as análises estatísticas:

a) Teste estatístico *Kappa* (k) descrito por JEKEL et al. (2002), para resultados classificados como positivos e negativos (P/N) ou presença/ausência. Para interpretar o resultado, foi usada a seguinte divisão arbitrária:

Tabela 1- Interpretação do valor de *Kappa*

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,20	Fraca
0,20 — 0,40	Mínima
0,40 — 0,60	Ruim
0,60 — 0,80	Boa
0,80 — 1,0	Excelente

b) Sensibilidade (S) e a *especificidade* (E) das Técnicas TSD-C e TSD-R, tendo como “*padrão-ouro*” a TFTM, para se verificar a concordância das técnicas para a determinação de C.T. e C.F. em diferentes tipos de águas.

Inicialmente, foram elaboradas Tabelas contendo as distribuições das freqüências de determinações de C.T. e C.F., expressos em NMP/100mL. Para os diferentes tipos de águas analisadas; também foram elaboradas Tabelas contendo a distribuição das freqüências de determinações destes microrganismos agrupando-se todas as amostras de água analisadas. Essas distribuições foram usadas para a descrição e avaliação da concordância de resultados das duas Técnicas de Substratos Definidos, em relação à Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos.

Em seguida, tomando-se apenas duas categorias de resultados, o positivo e o negativo (presença ou ausência de coliformes), foram determinadas a *sensibilidade* e a *especificidade* das Técnicas de Substratos Definidos TSD-C e TSD-R, utilizando-se a TFTM como o “*padrão-ouro*”, uma vez que esta técnica já foi padronizada e recomendada por Organizações Internacionais para a determinação de coliformes em amostras de água há muitos anos.

A Tabela 2 esquematiza como foi realizada a distribuição dos resultados das análises de acordo com a técnica empregada.

Tabela 2- Distribuição dos resultados das análises de acordo com as técnicas empregadas.

Resultado das técnicas (TSD-C ou TSD-R)	Resultado do <i>padrão-ouro</i> (TFTM)		Total
	Ausente	Presente	
Negativo	a	b	a+b
Positivo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	

A *sensibilidade* representa a capacidade do método utilizado fornecer resultados positivos quando a bactéria estiver presente na amostra e é calculada pela fórmula $d/(b+d)$. A *especificidade* representa a capacidade do método, em julgamento fornecer resultados negativos quando a bactéria estiver ausente da amostra e é calculada pela fórmula $a/(a+c)$.

Outro procedimento utilizado para a comparação da eficiência dos métodos entre si foi a determinação do coeficiente *kappa*, que permite determinar a extensão na qual a concordância entre dois métodos poderia ser avaliada ao invés de levar-se em consideração somente a concordância atribuída ao acaso. Definindo:

$$a+d= P_o \text{ (concordância observada)}$$

$$a+b+c+d= N \text{ (concordância máxima possível)}$$

$$(a+b)*(a+c)/N= E_a \text{ (concordância esperada ao acaso na célula a)}$$

$$(c+d)*(b+d)/N= E_d \text{ (concordância esperada ao acaso na célula d)}$$

$$E_a+ E_d= P_e \text{ (concordância total esperada ao acaso)}$$

O coeficiente *kappa* (κ) é dado pela razão:

$$\kappa= (P_o - P_e)/(N - P_e)$$

O coeficiente *kappa* informa a proporção de concordâncias além da esperada pelo acaso e varia de -1 (completa discordância) a 1 (concordância perfeita). Para interpretar o resultado, geralmente é usada a seguinte divisão arbitrária: abaixo de 0,20 a concordância é fraca, de 0,20 a 0,40 é mínima, de 0,40 a 0,60 é ruim, de 0,60 a 0,80 é boa e acima de 0,80 a concordância é excelente, conforme a Tabela 1.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados das análises de coliformes totais e coliformes fecais, expressos em NMP/100mL

Nas Tabelas 1, 2 e 3 do Apêndice A podem ser observados os resultados das determinações de C.T. e C.F., em NMP/100ml, obtidos respectivamente, em águas de sistemas de abastecimento público (tratada), águas de superfície (rios, córregos, riachos, represas e lagos) e águas subterrâneas (poços rasos, nascentes e poços profundos) quando foram empregadas as três técnicas em estudo: TSD-C, TSD-R e TFTM.

Nas Tabelas a seguir são apresentados os resultados estatísticos (frequência absoluta e percentuais) referentes às determinações de C.T. e de C.F. para cada tipo de água analisada. Na seqüência são apresentados também os mesmos resultados estatísticos referente às determinações dos microrganismos nos vários grupos de água analisadas, isto é, independentemente do tipo de água.

Nas Tabelas 3 e 4 observa-se, respectivamente, a distribuição das frequências absoluta e percentual para a determinação de C.T. e C.F., em NMP/100mL, em amostras de água de sistemas de abastecimento público (água tratada) analisadas pelas três técnicas em estudo.

Tabela 3 - Distribuição de frequências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de sistemas de abastecimento público (água tratada) determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Frequência / %	TSD-R Frequência / %	TFTM Frequência / %
<1,1	71 (97,3)	71 (97,3)	71 (97,3)
1,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2,2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
3,6	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
5,1	1 (1,4)	2 (2,7)	0 (0,0)
6,9	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
9,2	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,7)
12,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
16,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
23,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
>23,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Tabela 4 - Distribuição de frequências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de sistemas de abastecimento público (água tratada) determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Frequência / %	TSD-R Frequência / %	TFTM Frequência / %
<1,1	73 (100,0)	73 (100,0)	71 (97,3)
1,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2,2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
3,6	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
5,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
6,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
9,2	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)
12,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
16,1	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)
23,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
>23,0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Nota-se que a ausência de coliformes totais ou fecais (NMP <1.1) é praticamente, total nestas amostras e, portanto os três métodos utilizados, apresentam indiscutivelmente, concordância muito boa.

As Tabelas 5 e 6 mostram, respectivamente, as distribuições das freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais e coliformes fecais, em NMP/100mL, em amostras de água de superfície analisadas pelos três métodos em estudo.

Tabela 5 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de superfície determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
1,1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2,2	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)
3,6	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,1)
5,1	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,7)
6,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)
9,2	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,1)
12,0	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,1)
16,1	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,1)
23,0	0 (0,0)	1 (1,4)	6 (8,2)
>23,0	73 (100,0)	72 (98,6)	51 (69,9)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Na Tabela 5 nota-se que nas águas de superfície a presença de coliformes totais é uma constante. As Técnicas de Substratos Definidos – TSD-C e TSD-R, quando comparadas à TFTM, conseguem detectar um número mais elevado de coliformes totais, (TSD-C- 100% das amostras e TSD-R - 98,6% apresentaram contagem >23,0), demonstrando sua capacidade maior de recuperação e

crescimento destes microrganismos, em relação a TFTM; entretanto, observa-se que a positividade para coliformes totais foi igual nas três técnicas.

Tabela 6 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água de superfície determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	12 (16,4)	1 (1,4)	0 (0,0)
1,1	4 (5,5)	3 (4,1)	0 (0,0)
2,2	2 (2,7)	0 (0,0)	2 (2,7)
3,6	1 (1,4)	4 (5,5)	2 (2,7)
5,1	2 (2,7)	2 (2,7)	0 (0,0)
6,9	1 (1,4)	2 (2,7)	2 (2,7)
9,2	1 (1,4)	2 (2,7)	1 (1,4)
12,0	2 (2,7)	2 (2,7)	5 (6,8)
16,1	1 (1,4)	2 (2,7)	6 (8,2)
23,0	6 (8,2)	3 (4,1)	7 (9,6)
>23,0	41 (56,2)	52 (71,2)	48 (65,8)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Em relação a coliformes fecais observa-se na Tabela 6 que o número de amostras negativas (NMP <1,1) foi maior na TSD-C quando comparado com as outras duas técnicas (TSD-R e TFTM). Isto ocorre devido a TSD-C, segundo o fabricante, ser específica para *E. coli*, diferentemente das outras que também detectam outros coliformes fecais que não *E. coli*.

As Tabelas 7 e 8 ilustram, respectivamente, as distribuições das freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais e coliformes fecais, em NMP/100mL, em amostras de água subterrânea analisadas pelos três métodos em estudo.

Tabela 7 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água subterrânea determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM)

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	19 (26,0)	20 (27,4)	22 (30,1)
1,1	1 (1,4)	2 (2,7)	1 (1,4)
2,2	1 (1,4)	3 (4,1)	0 (0,0)
3,6	4 (5,5)	4 (5,5)	4 (5,5)
5,1	2 (2,7)	2 (2,7)	1 (1,4)
6,9	4 (5,5)	2 (2,7)	4 (5,5)
9,2	1 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,7)
12,0	0 (0,0)	1 (1,4)	1 (1,4)
16,1	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,1)
23,0	1 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,7)
>23,0	40 (54,8)	39 (53,4)	33 (45,2)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Na Tabela 7 observa-se que as três técnicas apresentaram quantificações semelhantes tanto em relação à ausência (TSD-C -26%, TSD-R 27,4% e TFTM 30%), quanto à presença de coliformes totais. Observa-se, também, que o NMP >23,0 ocorreu com mais freqüência nas técnicas TSD-C e TSD-R respectivamente em 54,8% e 53,4% das amostras, mostrando sua maior capacidade de recuperação e crescimento de bactérias.

Tabela 8 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 73 amostras de água subterrânea determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	39 (53,4)	37 (50,7)	24 (32,9)
1,1	3 (4,1)	7 (9,6)	2 (2,7)
2,2	2 (2,7)	2 (2,7)	3 (4,1)
3,6	3 (4,1)	1 (1,4)	5 (6,8)
5,1	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
6,9	2 (2,7)	1 (1,4)	3 (4,1)
9,2	0 (0,0)	2 (2,7)	4 (5,5)
12,0	1 (1,4)	1 (1,4)	3 (4,1)
16,1	0 (0,0)	2 (2,7)	4 (5,5)
23,0	3 (4,1)	0 (0,0)	4 (5,5)
>23,0	19 (26,0)	20 (27,4)	21 (28,8)
Total	73 (100,0)	73 (100,0)	73 (100,0)

Na Tabela 8 verifica-se que os resultados negativos (NMP <1,1) apresentaram-se em freqüência maior para TSD-C e TSD-R do que a TFTM diferindo do que ocorreu em águas de superfície. Quando o NMP era >23,0, as três técnicas apresentaram resultados semelhantes, porém considerando o total de amostras positivas a TFTM apresentou maior freqüência de resultados positivos. Presume-se que ocorra alguma variável que tenha contribuído para alterar este resultado.

Considerando as amostras de água de diferentes origens reunidas em um só conjunto, pode-se observar pelas tabelas 9 e 10, respectivamente, que as distribuições de freqüências absolutas e percentuais de coliformes totais e fecais, em NMP/100mL, corroboram os resultados das distribuições individuais.

Tabela 9 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes totais, em NMP/100mL, em 219 amostras de água de diferentes origens determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	90 (41,1)	91 (41,6)	93 (42,5)
1,1	1 (0,5)	2 (0,9)	1 (0,5)
2,2	1 (0,5)	3 (1,4)	1 (0,5)
3,6	4 (1,8)	4 (1,8)	7 (3,2)
5,1	3 (1,4)	4 (1,8)	3 (1,4)
6,9	5 (2,3)	2 (0,9)	5 (2,3)
9,2	1 (0,5)	0 (0,0)	7 (3,2)
12,0	0 (0,0)	1 (0,5)	4 (1,8)
16,1	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (2,7)
23,0	1 (0,5)	1 (0,5)	8 (3,7)
>23,0	113 (51,6)	111 (50,7)	84 (38,4)
Total	219 (100,0)	219 (100,0)	219 (100,0)

Tabela 10 - Distribuição de freqüências absolutas e percentuais para a determinação de coliformes fecais, em NMP/100mL, em 219 amostras de água de diferentes origens determinados pelas três técnicas em estudo (TSD-C, TSD-R e TFTM).

NMP/100mL	TSD-C Freqüência / %	TSD-R Freqüência / %	TFTM Freqüência / %
<1,1	124 (56,6)	111 (50,7)	95 (43,4)
1,1	7 (3,2)	10 (4,6)	2 (0,9)
2,2	4 (1,8)	2 (0,9)	5 (2,3)
3,6	4 (1,8)	5 (2,3)	7 (3,2)
5,1	3 (1,4)	2 (0,9)	0 (0,0)
6,9	3 (1,4)	3 (1,4)	5 (2,3)
9,2	1 (0,5)	4 (1,8)	6 (2,7)
12,0	3 (1,4)	3 (1,4)	8 (3,7)
16,1	1 (0,5)	4 (1,8)	11 (5,0)
23,0	9 (4,1)	3 (1,4)	11 (5,0)
>23,0	60 (27,4)	72 (32,9)	69 (31,5)
Total	219 (100,0)	219 (100,0)	219 (100,0)

Observando-se a Tabela 9 na determinação de NMP <1,1 (negativo) foi semelhante entre as três técnicas estudadas. Considerando-se a faixa de NMP >23,0 as técnicas TSD-C e TSD-R apresentaram resultados semelhantes que foram bem maiores que os resultados encontrados pela TFTM. Nas faixas, 1,1 a 23,0 foi encontrada maior frequência, de resultados positivos para TFTM demonstrando que as técnicas de substratos definidos recuperam números mais elevados que o padrão ouro. Entretanto, considerando apenas resultados positivos e negativos as três técnicas se equivalem.

Na Tabela 10 observa-se que na faixa negativa (<1,1) a TSD-C apresenta frequência maior que a TSD-R e que a TFTM, o que permite dizer que TSD-C é específico para *E. coli*, enquanto TFTM e TSD-R permitem o crescimento de outros coliformes fecais que não *E. coli*, ou seja, verifica-se que TSD-R e TFTM têm positividade maior e considerando-se todas as amostras positivas concluí-se que a restrição de crescimento de outros coliformes que não *E. coli* na TSD-C favorece a maior positividade nas outras duas técnicas.

Na Tabela 11 estão reunidos os números de concordância dos NMP/100mL: <1,1; >23,0 e entre esses dois limites (intermediários) nas determinações de coliformes totais pelas técnicas TSD-C e TSD-R, em relação à TFTM.

Considerando os coliformes fecais, são mostrados na Tabela 12 os números de concordância dos NMP/100mL classificados como anteriormente.

Tabela 11- Número de concordâncias de resultados de determinações de coliformes totais das técnicas de análise em relação ao total de determinação da TFTM.

Determinações de C.T. em NMP/100mL	TSD-C/TFTM	TSD-R/TFTM	Total de determinações da TFTM
<1,1	89	91	93
Intermediários	3	2	42
>23,0	83	83	84

Tabela 12 – Número de concordâncias de resultados de determinações de coliformes fecais das técnicas de análise em relação ao total de determinação da TFTM.

Determinações de C.F. em NMP/100MI	TSD-C/TFTM	TSD-R/TFTM	Total de determinações da TFTM
<1,1	95	95	95
Intermediários	2	3	55
>23,0	43	51	69

Com referência aos resultados das determinações de NMP/100mL, nas faixas intermediárias (1,1 até 23,0) deve-se levar em consideração que, apesar das alíquotas de 100mL utilizadas serem originadas de uma mesma amostra, a técnica de homogeneização, provavelmente não é suficiente para distribuir esses microrganismos uniformemente, em toda a massa de água, gerando pequenas diferenças nas contagens de NMP quando se compara as três técnicas em estudo.

A seguir, procedeu-se ao estudo das técnicas tomando-se os resultados de determinações de coliformes totais ou fecais, classificados como positivo e negativo quanto à presença ou ausência dos microrganismos citados.

5.2 Resultados das análises de coliformes totais e coliformes fecais, classificados em positivos ou negativos

Classificando os resultados expressos em NMP/100ml, como positivo ou negativo, de acordo com a presença ou ausência de coliformes, podem ser observados na Tabela 13, os números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes, quando foi empregada a TSD-C comparada com a TFTM e a TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes totais.

A reunião dos resultados dos três tipos de água permite uma comparação mais realista dos dois métodos rápidos utilizados para a determinação de coliformes totais e fecais.

Observa-se que nas duas Técnicas de Substratos Definidos, TSD-C e TSD-R, a sensibilidade e a especificidade são elevadas, todas maiores do que, 95%. O coeficiente *kappa* também é muito próximo de 1, indicando concordância ótima das TSD-C e TSD-R em relação a TFTM, para a determinação de coliformes totais.

Na Tabela 14 são mostrados os números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes quando foi empregada a técnica de TSD-C comparada com a TFTM e a técnica TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes fecais.

Nota-se que a especificidade é máxima (100%) em ambos os métodos rápidos empregados, a sensibilidade é alta para TSD-R (87,1%), e um pouco menor, para TSD-C (76,6%), em decorrência de que TSD-C é específico para *E. coli* e TSD-

R, da mesma forma que TFTM detecta outros coliformes fecais, além da *E. coli*. O coeficiente *kappa* é alto para TSD-R (0,85), indicando concordância ótima, e um pouco menor para TSD-C (0,74), indicando concordância boa.

Tabela 13 - Números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes quando foram empregadas as técnicas TSD-C comparada com a TFTM e a TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes totais.

TSD-C	TFTM		Total	TSD-R	TFTM		Total
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo	
Negativo	89	1	90	Negativo	91	0	91
Positivo	4	125	129	Positivo	2	126	128
Total	93	126	219	Total	93	126	219
Sensibilidade: 99,2%			Sensibilidade: 100,0%				
Especificidade: 95,7%			Especificidade: 97,8%				
Kappa: 0,95			Kappa: 0,98				

Tabela 14 - Números de amostras de águas de diferentes origens (águas de abastecimento público, de superfície ou subterrânea) que apresentaram resultados idênticos e discrepantes quando foram empregadas as técnicas TSD-C comparada com a TFTM e TSD-R comparada com a TFTM, para as determinações de coliformes fecais.

TSD-C	TFTM		Total	TSD-R	TFTM		Total
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo	
Negativo	95	29	124	Negativo	95	16	111
Positivo	0	95	95	Positivo	0	108	108
Total	95	124	219	Total	95	124	219
Sensibilidade: 76,6%			Sensibilidade: 87,1%				
Especificidade: 100,0%			Especificidade: 100,0%				
Kappa: 0,74			Kappa: 0,85				

6 DISCUSSÃO

Com base nos resultados encontrados no presente estudo pode-se compará-los com semelhantes pesquisas que vem sendo realizadas por diversos autores:

No Brasil, ALVES et al. (2002), utilizaram a técnica do Colilert® em Cartela (Quanti-Tray®/Idexx) para avaliar a qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento público da cidade de Marília/S.P. e avaliaram a recuperação de coliformes totais e fecais/*E. coli* pelo método em estudo.

No entanto, BUBERT et al. (2003) realizaram um estudo comparativo entre os métodos Colilert® (Idexx) e Readycult Coliformes® (Merck) (métodos rápidos utilizados no presente estudo) visando a detecção de *E. coli* O157:H7 em amostras de água artificialmente contaminadas com microrganismos e observaram que nenhum destes métodos foi capaz de detectar este sorotipo específico de *E. coli*.

O estudo de CATANUSIO NETO (2001) ressaltou a rapidez e praticidade do uso do método Colilert em relação a TFTM, para a avaliação das condições higiênico-sanitárias da água produzida por estações de tratamento, quando avaliou, 549 amostras, durante os anos de 1997 e 1998. Foi constatada a equivalência entre os métodos tanto, na quantificação como na qualificação de coliformes totais e fecais/*E. coli*.

Já CHAO et al. (2003), compararam a eficiência do método Colilert® (Quanti-Tray® 2000/Idexx) com o método tradicional de Filtração em Membrana para enumeração de coliformes totais e *E. coli* em 125 amostras de água de rios, nascentes ou poços (águas de diversas origens, como neste estudo) e observaram que a quantificação dos microrganismos coliformes totais e *E. coli* foi semelhante,

em ambos os métodos utilizados, obtendo, portanto, resultados semelhantes entre o método convencional e o método rápido.

Um estudo comparativo mais abrangente foi realizado por ECKNER (1998), utilizando a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, a Técnica da Membrana Filtrante, e o método Colilert®(Idexx) para enumeração de coliformes e *E. coli*. Foram analisadas, 261 amostras de água potável e 77 amostras de águas de recreação e o autor concluiu que o método Colilert®(Idexx) apresentou a mesma sensibilidade que os métodos convencionais empregados.

Tais achados coincidem com as observações de ECCLES et al. (2004), que em seu estudo comparativo, utilizando a Técnica da Membrana Filtrante e o método Colilert®(Quanti-Tray®2000/Idexx) para o isolamento e enumeração de *E. coli* em lodo de esgoto tratado, não observaram uma variação considerável no índice de recuperação do microrganismo, em qualquer dos métodos estudados.

A esse respeito, FRICKER et al. (1997), compararam a eficiência do método Colilert®/18(Quanti-Tray®/Idexx) e Colilert® (Quanti-Tray®/Idexx) com a técnica da Membrana Filtrante para recuperação de *E. coli* em amostras de água, artificialmente contaminadas com microrganismos. Concluíram não haver diferença significativa na detecção de coliformes totais e *E. coli* quando esses métodos foram empregados para monitorar a qualidade bacteriológica da água.

Resultados semelhantes a estes foram verificados por KRAMER et al. (2002) quando compararam a eficiência do método Colilert®(Quanti-Tray®/Idexx) com a Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos (TFTM) para enumeração de coliformes totais e coliformes fecais em lodo de esgoto ativado. Os resultados mostraram que o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais enumerados pela TFTM foi mais elevado que a quantificação de *Escherichia coli* pelo método

Quanti-Tray[®](Idexx); por outro lado observaram que o NMP de *E. coli* foi semelhante em ambos os métodos. Os autores concluíram que devido à facilidade de uso e redução do tempo de análise, o sistema Quanti-Tray[®](Idexx) pode ser bastante útil na enumeração *E. coli* em lodo de esgoto ativado.

NIEMELA et al. (2003) realizaram um estudo envolvendo, 20 laboratórios de 13 países europeus, comparando a eficiência do método Colilert[®](Quanti-Tray[®] 2000/Idexx) com o método convencional da Membrana Filtrante (técnica recomendada nos países europeus) e constataram que a tecnologia de substrato definido detectou contagens significativamente mais elevadas de coliformes e *E. coli* do que método padrão. Tais resultados revelaram menor eficiência do método da Membrana Filtrante em detectar a presença destes microrganismos em águas potáveis.

As técnicas Colilert[®](Idexx) e Fermentação em Tubos Múltiplos foram comparadas por PALMER et al. (1993) que puderam avaliar a recuperação de *E. coli* em amostras de água do mar, e não observaram diferença significativa entre os dois métodos testados.

O estudo comparativo de SCHETS et al. (2002) foi realizado entre os métodos Colilert[®]18 (Idexx), plaqueamento em Ágar Chromocult Coliforme e plaqueamento em meio específico para *E. coli*, visando quantificar coliformes totais e *E. coli* em águas de abastecimento público. Foi notado que o sistema Colilert[®]18(Idexx) apesar de ser um bom método alternativo apresentou contagens de coliformes totais mais elevadas e contagens de *E. coli* menores, quando comparado com os outros métodos.

YAKUB et al. (2002) realizaram estudo comparativo entre dois métodos rápidos: Colilert[®](Idexx) e Enterolert (Idexx) com a técnica convencional de Filtração

em Membrana para enumeração de bactérias indicadoras em águas de superfície e efluente de esgoto tratado e detectaram que a sensibilidade da Tecnologia de Substratos Definidos foi igual ou superior à técnica tradicional para a detecção dos microrganismos citados.

No presente estudo observou-se na quantificação de coliformes totais pelos métodos Colilert e ReadyCult que a sensibilidade e a especificidade foram elevadas, maior que 95%, e que o coeficiente *kappa* foi muito próximo de 1, o que indicou concordância ótima, entre estas técnicas e a TFTM. Na quantificação de coliformes fecais observou-se que a especificidade foi máxima (100%) em ambos os métodos rápidos, já a sensibilidade foi alta para o método TSD-R (87,1%), e um pouco menor para o método TSD-C (76,6%). O coeficiente *kappa* também foi alto para o método ReadyCult (0,85), indicando concordância ótima, e um pouco menor para o método Colilert (0,74) indicando concordância, boa. Como estas técnicas rápidas permitem a obtenção de resultados em 24 horas, representando grande vantagem pela rapidez e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento, elas devem ser o método de primeira escolha quando se deseja atingir estes objetivos.

7 CONCLUSÕES

- A ausência de coliformes totais ou fecais (NMP <1,1) observada em águas de abastecimento foi total em qualquer dos três métodos empregados, apresentando, indiscutivelmente, concordância, muito boa.

- Nas águas de superfície as técnicas de substratos definidos quando comparadas a TFTM, conseguiram detectar um número mais elevado de coliformes totais (NMP >23,0) demonstrando sua capacidade maior de recuperação e crescimento destes microrganismos do que a TFTM. Em relação a coliformes fecais observou-se que o número de amostras negativas (NMP <1,1) foi maior na TSD-C quando comparado com as técnicas TSD-R e TFTM.

- Para águas subterrâneas observou-se que as três técnicas apresentaram quantificações semelhantes, tanto em relação a ausência como presença de coliformes totais. Em relação aos coliformes fecais verificou-se que para resultados negativos (NMP <1,1) as técnicas TSD-C e TSD-R apresentaram uma frequência maior que a TFTM, porém considerando o total de amostras positivas a TFTM apresentou maior frequência de resultados positivos.

- Para as determinações de coliformes totais nos métodos TSD-C e TSD-R a sensibilidade e a especificidade foram bem elevadas, maiores do que, 95%. O coeficiente *kappa* foi muito próximo de 1, indicando concordância ótima das técnicas TSD-C e TSD-R, em relação a TFTM para a determinação de coliformes totais.

- Nas técnicas TSD-C e TSD-R a especificidade é máxima (100%) para as determinações de coliformes fecais, sendo a sensibilidade alta para TSD-R (87,4%) e um pouco menor para TSD-C (77,2%). O coeficiente *kappa* foi alto para TSD-R

(0,85), indicando concordância, ótima e um pouco menor para o TSD-C (0,74) indicando concordância, boa para as determinações de coliformes fecais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Rev. Saúde Pública** v.37, n.4, p.510-514, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16th ed. Washington, D.C., 1992. p.9.68-9.69.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, D.C., 1998. p.9-140.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16th ed. Virginia: 1995. p.15-17.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3.ed. São Paulo: CETESB, 1986. 616p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518 de 25 de março de 2004. Normas e Padrão da potabilidade de água destinada ao consumo humano. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 26 de março de 2004, seção 1, p.266.

BROMBERG, E. **Safe drinking water:** microbial standards help ensure water quality for consumers. Champaign, Cooperative Extension service, University of Illinois at Urbana, 1995. p.6.

BUBERT, A.; PAIVA, G.; SMITH, P.; BULTE, M.. Rapid and simple detection of *E. coli* O157:H7 in water samples after enrichment with ReadyCult. Philadelphia, USA: Poster WQTC conference, 2003.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas. **Hig. Alim.**, v.15,p.83-92, 2001.

CARMOUZE, J. P. **O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos:** fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher, 1994, 253p.

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.

CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água.** São Paulo, 1998. 150p.

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**, v.36, n.4, p.288-293, 2003.

CLARK, J.A; EL-SHAARAWI, A H. Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of Total Coliforms, *Escherichia coli* and other indicator bacteria. **Appl. Env. Microbiol.**, v.59, p.380-388, 1993.

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.

COWBURN, J. K.; GOODALL, T.; FRICKER, E. J.; WALTER, K. S.; FRICKER, C. R. A preliminary study of the use of colilert for water quality monitoring. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.19, p.50-52, 1994.

COVERT, T.C.; SHADIX, L.C.; RICE, E.W.; HAINES, J.R.; FREYBERG, R.W. Evaluation of the auto-analysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. **Appl. Environ. Microb.**, v.54, p.215-229, 1989.

D`AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C, MIRANDA, C. A. S., FERREIRA, A. P. 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.; MENDES, A. C. R.; CUNHA NETO, A.; COSTA, S. M. S. 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.; SEARLE, R.; HOLT., D.; DENNIS, P. J. A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally terated sewage sludge. **J. Appl. Microbiol.**, v.96, n.2, p. 375-383, 2004.

ECKNER, K. F. Comparison of membrana 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. Envirom. Microb.**, v.64, p.3079-3083, 1998.

EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J.; SMITH, D. B.; KRIZ, N.. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. **Appl. Environ. Micobiol.**, v.56, p.366-369,1990

EIROA, M.N.U.; JUNQUEIRA,V.C.A; SILVEIRA, N.F.A Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. **Ciên. Tecnol. Alim.**, v.16, p.165-169, 1996.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência FINEP, 1988. 574p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 2003. 182p.

FRICKER, E. J. and FRICKER, C. R. Use of two presence/absence systems for the detection of *Escherichia coli* and coliforms from water. **Wat. Res.**, v.30, n.9, p. 2226-2228, 1996.

FRICKER, E. J.; LLLINGWORTH, K. S.; Fricker, C. R. Use of two formulations of colilert and quantitray for assessment of the bacteriological quality of water. **Wat. Res.**, v.31, n. 10, p. 2495-2499,1997.

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.

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. Alim.**, v.12, p.49-51, 1998.

GRABOW, W. Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. **Water S.A** , v.22, p.193-202, 1996.

HELLER, L. **Saneamiento y salud**. Lima: CEPIS/OPS, 1997.

IDEXX LABORATORIES. Disponível em: <<http://al.idexx.com/agua/>>. Acesso em: 13 jan. 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microrganisms in foods 1**: their significance and methods of enumeration. London. 1978, p.433.

ISAAC-MARQUEZ AP; LEZAMA-DAVILA, C. M.; KU-PECA, P. P.; TAMAY-SEGOVIA, P. Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano en Campeche. **Salud Pública Méx** ,v.36,n. 6, p.655-661, 1994.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.328.

KATAMAY, M.M. Assessing defined-substrate technology for meeting monitoring requirements of total coliform rule. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.82, p.83-87,1990.

KRAMER, M. H.; HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; JURANEK, D. D. Water- borne disease: 1993 and 1994. **Am. Water Work Ass.**, v.88, p.66-80, 1994.

KRAMER, T. A.; LIU, J. Enumeration of coliform bacteria in wastewater solids using defined substrate technology. **Water Environ Res.**, v. 4, n. 6, p.526-530, 2002.

LUZ, F. X. R. Aterro sanitário: característica, limitações, tecnologia para implantação e operação. Seminário sobre aterros sanitários. São Paulo: CETESB, p.1-30, 1981.

MANAFI, M. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. **Int. J. Food Microbiol.**, v.31, p. 45- 58, 1996.

MANAFI, M. **New approaches for the fast detection of indicators, in particular enzyme detection methods (EDM)**. OECD Workshop Interlaken'98 on Molecular Technologies for Safe Drinking Water. Switzerland, 1998. Congress Center Interlaken, 1998, Switzerland.

MANAFI, M. New developments on chromogenic and fluorogenic culture media **Int. J. Food Microbiol.**, v. 60, p.205-218, 2000.

MANAFI, M. New medium for simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. Annual meet. am. soc. microbiol., **95th**, 1995, Washington. **American Society for Microbiology**, p-43-50.

MANAFI, M.; ROSMANN, H. Evaluation of readycult presence-absence test for detection of total coliforms and *E.coli* in water. Abstr. Q-263, **98th**, 1998, Washington. **Am. Soc. Microbiol.**, p. 464.

MERCK products. Disponível em: < <http://pb.merck.de/>>. Acesso em: 13 jan. 2005.

MOTA, S. **Introdução à engenharia ambiental**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 1997. 292p.

NIEMELA, S. I.; LEE, J. V.; FRICKER; C. R. A comparison of the international standards organisation 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.

PALMER, C. J.; TSAI, Y. L.; LANG, A. L.; SANGERMANO, L. R. Evaluation of colilert-marine water for detection of total coliforms na *Escherichia coli* in the marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.3, p.786-790, 1993.

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

PELLIZZARI, V.H.; PEDROSO, D. M. M.; KIRSCHNER, C. C.; SILVA, L. A. G.; MARTINS, M. T. Assessment of media using β -D-glucuronidase activity for the detection of *Escherichia coli* in water. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.24, p. 182-186, 1993.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 516p.

SCHETS, F. M.; NOBEL, P. J.; STRTING, S.; MOOIJMAN, K. A., ENGELS, G. B. ; BROUWER, A.. EU 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 ma de Recife- PE. **Hig. Alim.** v.15, p.73-78, 2001.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; JUNQUEIRA, V. C. A.; CATANÚSIO NETO,R.
Manual de métodos de análise microbiológica da água. Campinas: ITAL/ Núcleo de Microbiologia, 2000. 99p. (Manual Técnico).

UNITED STATES FOODS AND DRUG ADMINISTRATION & ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Bacteriological analytical manual.** 7 ed. Washington, 1992. 529p.

VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3rd ed. Washington: APHA, 1992. 1219p.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality.** 2nd ed. Geneva, 1996. V.1. 1234p.

YAKUB, G. P.; CASTRIC, D. A.; STADTERMAN-KNAUER, K. L.; TOBIN, M. J.;
BLAZINA, M.; HEINEMAN, T. N.; YEE, G. Y.; FRAZIER, L. Evaluation of colilert and enterolert defined substrate methodology for wastewater applications. **Water Environ. Res.**, v.74, p. 131-135, 2002.

APÊNDICE A

62.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
63.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
64.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
65.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
66.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
67.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
68.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
69.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
70.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
71.	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
72.	5,1	<1,1	5,1	<1,1	9,2	16,1
73.	6,9	<1,1	5,1	<1,1	9,2	9,2

Tabela 2 – Determinação de C.T. e C.F., em NMP/100ml, em 73 amostras de águas de superfície (rios, córregos, riachos, represas e lagos) pelo emprego das Técnicas TSD-C, TSD-R e TFTM.

Amostra	TSD-C		TSD-R		TFTM	
	C.T.	C.F.	C.T.	C.F.	C.T.	C.F.
1.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
2.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
3.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
4.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
5.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
6.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
7.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
8.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
9.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
10.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
11.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
12.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
13.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
14.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
15.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
16.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
17.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
18.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
19.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
20.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
21.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
22.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
23.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
24.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
25.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
26.	>23	23,0	>23	>23	>23	>23
27.	>23	>23	>23	>23	>23	16,1
28.	>23	3,6	>23	9,2	>23	>23

29.	>23	<1,1	>23	6,9	>23	>23
30.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
31.	>23	23,0	>23	>23	3,6	3,6
32.	>23	>23	>23	>23	3,6	3,6
33.	>23	9,2	>23	6,9	>23	>23
34.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
35.	>23	23,0	>23	>23	>23	>23
36.	>23	2,2	>23	3,6	9,2	>23
37.	>23	1,1	>23	5,1	>23	>23
38.	>23	2,2	>23	3,6	>23	>23
39.	>23	>23	>23	>23	12,0	>23
40.	>23	>23	>23	>23	>23	23,0
41.	>23	>23	>23	>23	23,0	23,0
42.	>23	>23	>23	>23	16,1	6,9
43.	>23	<1,1	>23	3,6	23,0	>23
44.	>23	1,1	>23	>23	>23	>23
45.	>23	<1,1	>23	<1,1	>23	16,1
46.	>23	<1,1	>23	1,1	>23	>23
47.	>23	<1,1	>23	1,1	>23	>23
48.	>23	<1,1	>23	1,1	16,1	16,1
49.	>23	<1,1	>23	16,1	16,1	16,1
50.	>23	<1,1	>23	>23	2,2	2,2
51.	>23	1,1	>23	>23	>23	>23
52.	>23	<1,1	>23	>23	>23	>23
53.	>23	<1,1	>23	>23	>23	>23
54.	>23	>23	>23	>23	23,0	23,0
55.	>23	>23	>23	>23	6,9	6,9
56.	>23	<1,1	>23	>23	3,6	2,2
57.	>23	<1,1	>23	>23	12,0	>23
58.	>23	23,0	>23	>23	23,0	23,0
59.	>23	>23	>23	>23	23,0	12,0
60.	>23	>23	>23	>23	>23	16,1
61.	>23	23,0	>23	23,0	9,2	12,0

62.	>23	23,0	23,0	23,0	5,1	9,2
63.	>23	5,1	>23	16,1	5,1	12,0
64.	>23	12,0	>23	12,0	23,0	23,0
65.	>23	5,1	>23	3,6	>23	>23
66.	>23	12,0	>23	5,1	>23	23,0
67.	>23	>23	>23	>23	>23	12,0
68.	>23	1,1	>23	12,0	>23	>23
69.	>23	>23	>23	>23	9,2	16,1
70.	>23	>23	>23	>23	12,0	>23
71.	>23	16,1	>23	>23	>23	>23
72.	>23	6,9	>23	9,2	>23	12,0
73.	>23	>23	>23	23,0	>23	23,0

29.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
30.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
31.	>23	>23	>23	>23	>23	>23
32.	>23	<1,1	>23	1,1	9,2	3,6
33.	2,2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
34.	3,6	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
35.	6,9	<1,1	3,6	<1,1	<1,1	<1,1
36.	>23	<1,1	>23	<1,1	<1,1	<1,1
37.	>23	5,1	>23	2,2	>23	3,6
38.	>23	12	>23	16,1	>23	23
39.	<1,1	<1,1	1,1	1,1	3,6	3,6
40.	>23	6,9	>23	9,2	9,2	9,2
41.	>23	>23	>23	>23	>23	9,2
42.	>23	3,6	>23	2,2	12	9,2
43.	>23	>23	>23	>23	>23	16,1
44.	>23	>23	>23	>23	>23	6,9
45.	>23	6,9	>23	6,9	>23	>23
46.	>23	23	>23	>23	>23	12
47.	>23	23	>23	16,1	>23	12
48.	<1,1	1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1,1
49.	>23	>23	>23	>23	23	23
50.	>23	2,2	>23	9,2	>23	>23
51.	5,1	<1,1	1,1	<1,1	1,1	1,1
52.	>23	<1,1	>23	1,1	6,9	3,6
53.	23	23	12	12	16,1	>23
54.	>23	3,6	>23	3,6	>23	16,1
55.	>23	3,6	>23	1,1	>23	16,1
56.	3,6	<1,1	2,2	<1,1	3,6	<1,1
57.	5,1	<1,1	3,6	<1,1	>23	6,9
58.	>23	<1,1	>23	1,1	>23	>23
59.	>23	1,1	>23	1,1	>23	>23
60.	>23	1,1	>23	<1,1	>23	16,1
61.	3,6	<1,1	6,9	<1,1	6,9	<1,1

62.	>23	<1,1	>23	<1,1	>23	>23
63.	6,9	<1,1	5,1	<1,1	6,9	3,6
64.	>23	<1,1	3,6	<1,1	23	12
65.	>23	>23	>23	>23	3,6	2,2
66.	1,1	<1,1	5,1	<1,1	3,6	2,2
67.	6,9	<1,1	3,6	<1,1	6,9	<1,1
68.	3,6	<1,1	2,2	<1,1	5,1	2,2
69.	>23	<1,1	>23	<1,1	>23	23
70.	6,9	<1,1	6,9	<1,1	16,1	9,2
71.	9,2	<1,1	2,2	<1,1	16,1	23
72.	>23	<1,1	>23	<1,1	>23	>23
73.	>23	2,2	>23	1,1	>23	6,9

ANEXO A

Tabela 1 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de porções de 10mL da amostra por tubo (APHA,1998).

Número de Tubos Positivos	NMP/100mL	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Mínimo	Máximo
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinito

Tabela 2 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 5 porções de 10mL da amostra por tubo (APHA,1998).

Número de Tubos Positivos	NMP/100mL	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Mínimo	Máximo
0	<2.2	0	6.0
1	2.2	0.1	12.6
2	5.1	0.5	19.2
3	9.2	1.6	29.4
4	16.0	3.3	52.9
5	>16.0	8.0	infinito

Tabela 3 – Índice do NMP e limites de confiança de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos quando 5 tubos são usados por diluição da amostra por tubo (APHA,1998).

Combinação de tubos positivos	NMP/100mL	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Inferior	Superior
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
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	26	12.0	63

4-2-0	22	9.0	56
4-2-1	26	12.0	65
4-3-0	27	12.0	67
4-3-1	33	15.0	77
4-4-0	34	16.0	80
5-0-0	23	9.0	86
5-0-1	30	10.0	110
5-0-2	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
5-3-2	140	60.0	360
5-3-3	170	80.0	410
5-4-0	130	50.0	390
5-4-1	170	70.0	480
5-4-2	220	100.0	580
5-4-3	280	120.0	690
5-4-4	350	160.0	820
5-5-0	240	100.0	940
5-5-1	300	100.0	1300
5-5-2	500	200.0	2000
5-5-3	900	300.0	2900
5-5-4	1600	600.0	5300
5-5-5	>1600	-	-

ANEXO B

Tabela 1- Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para o número de cavidades com reação positiva para o Quanti-Tray®(Idexx) (IDEXX, 2005).

Números de cavidades com reação positiva	NMP/100mL	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Inferior	Superior
0	0.0	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.1
25	34.4	23.3	51.2

26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.1
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	>200.5	146.1	infinito

Tabela 2- Número Mais Provável (NMP)/100mL de água e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para o número de cavidades com reação positiva para o Quanti-Tray® 2000 (Idexx) (IDEXX, 2005).

ANEXO C

Tabela 1- Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2004).

PARÂMETRO	VMP (1)
ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO (2)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes (3)	Ausência em 100ml
ÁGUA NA SAÍDA DO TRATAMENTO	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
ÁGUA TRATADA NO SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO (RESERVATÓRIOS E REDE)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes (3)	Ausência em 100ml
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml

NOTAS:

(1) Valor Máximo Permitido.

(2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

Tabela 2- Número mínimo de amostras mensais para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises microbiológicas, em função da população abastecida (BRASIL, 2004).

PARÂMETRO	SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO (RESERVATÓRIOS E REDE)			
	População abastecida			
	< 5.000 hab.	5.000 a 20.000 hab.	20.000 a 250.000 hab.	^a > 250.000 hab.
Coliformes totais	10	1 para cada 500 hab.	30 + (1 para cada 2.000 hab.)	105 + (1 para cada 5.000 hab.) Máximo de 1.000