



NORMA TÉCNICA

L5.202

Jan/93
39 PÁGINAS

Coliformes totais e fecais - determinação pela técnica de tubos múltiplos: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	COLIFORMES TOTAIS E FECAIS - DETERMINAÇÃO PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS Método de ensaio	L5.202 JAN/93
--------	--	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução	1
1 Objetivo	2
2 Documento complementar	3
3 Definições	3
4 Aparelhagem	5
5 Meios de cultura e soluções	8
6 Execução do ensaio	15
7 Resultados	26
Anexo A - Informações complementares	37
Anexo B - Referências bibliográficas	39

INTRODUÇÃO

As águas de abastecimento apresentam o risco de serem poluídas por águas residuárias e excretas de origem humana ou animal, podendo, desta forma, conter organismos patogênicos, tornando-se assim um veículo de transmissão de doenças. Por isso, impõe-se a necessidade de exames rotineiros das mesmas, para determinar seu grau de segurança do ponto de vista bacteriológico.

Embora já existam métodos desenvolvidos para detecção de vários organismos patogênicos de veiculação hídrica, os mesmos não são aplicados na rotina devido ao alto custo e necessidade de pessoal especializado. Além disso, uma vez que o lançamento de organismos patogênicos nos esgotos é intermitente e está na dependência das condições de saúde da população, é possível que, em determinadas ocasiões, não se detectem esses organismos na água, porém sua ausência não indica que a mesma seja segura.

Para a avaliação das condições sanitárias de uma água, utilizam-se bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de poluição fecal, pois estão sempre presentes no trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, sendo eliminadas em grandes números pelas fezes. A presença de coliformes na água indica poluição, com o risco potencial da presença de organismos patogênicos, e sua ausência é evidência de uma água bacteriologicamente potável, uma vez que são mais resistentes na água que as bactérias patogêni

cas de origem intestinal.

Como o grupo dos coliformes totais inclui gêneros que não são de origem exclusivamente fecal, isto limita sua aplicação como indicador específico de contaminação fecal. O reconhecimento deste fato levou ao desenvolvimento de métodos de enumeração de um subgrupo de coliformes denominados coliformes fecais (coliformes termotolerantes), os quais são diferenciados dos coliformes totais pela sua capacidade de fermentar a lactose em temperatura elevada (44,5°C).

Embora a utilização dos coliformes fecais, em substituição aos totais, tenha determinado uma melhoria significativa na detecção da contaminação fecal, logo se tornou evidente a existência de outros coliformes termotolerantes além de E.coli (principalmente Klebsiella), os quais, por não serem de origem exclusivamente fecal, comprometiam a especificidade deste subgrupo para a finalidade proposta. Em decorrência disto, as tendências atuais se direcionam para a detecção específica de E.coli, que é o único componente do grupo coliforme de origem exclusivamente fecal.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve a técnica dos tubos múltiplos, utilizada na determinação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme para:

1.1 Avaliação e controle de qualidade bacteriológica de águas destinadas a consumo humano (sem ou com desinfecção ou após tratamento convencional).

1.2 Avaliação e controle de qualidade de mananciais que abastecem estações de tratamento de água.

1.3 Avaliação e controle de águas destinadas:

- a) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas, culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- b) à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho);
- c) à dessedentação de animais;
- d) à criação natural ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana;
- e) ao abastecimento industrial.

1.4 Avaliação da eficiência de processos de tratamento de águas e águas residuárias domésticas ou industriais.

2 DOCUMENTO COMPLEMENTAR

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.12.

3.1 Coliformes totais

Grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 35°C em 24-48 horas. No caso da técnica de tubos múltiplos, são considerados coliformes os organismos que fermentam a lactose com produção de gás a 35°C. O grupo inclui os seguintes gêneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella.

3.2 Coliformes fecais ou coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas. O principal componente deste grupo é Escherichia coli, sendo que alguns coliformes do gênero Klebsiella apresentam também essa capacidade.

3.3 Caldo lactosado

Meio de enriquecimento, no qual as concentrações de lactose e peptona fornecem condições ótimas para o crescimento de bactérias do grupo coliforme.

3.4 Caldo lauril triptose

Meio de enriquecimento para bactérias do grupo coliforme, em que o lauril sulfato de sódio atua como agente seletivo, com supressão do crescimento de bactérias esporuladas produtoras de gás.

3.5 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (CLVBB)

Meio seletivo, em que ocorre inibição de bactérias Gram-positivas e de bactérias esporuladas fermentadoras da lactose, permitindo um bom desenvolvimento de bactérias do grupo coliforme.

3.6 Meio EC

Meio seletivo para detecção de coliformes fecais, em que os sais biliares inibem o crescimento de formas esporuladas e de bactérias Gram-positivas e cuja incubação a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ permite a seleção

dos coliformes de origem fecal (coliformes termotolerantes).

3.7 Número mais provável (NMP)

É a estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos através da aplicação da técnica de tubos múltiplos.

3.8 Esporos

Estruturas especializadas que se formam em certas bactérias Gram-positivas sob condições inadequadas. Os esporos não apresentam atividade metabólica e são muito mais resistentes aos efeitos do calor, dessecação, congelamento, drogas deletérias e radiações que as próprias células que os formam.

3.9 Bacilo

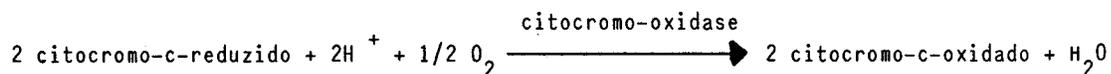
Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.10 Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta.

3.11 Teste de oxidase

Este teste tem por finalidade evidenciar a presença da citocromo-oxidase, uma enzima da cadeia respiratória de certas bactérias. Esta enzima é necessária para a oxidação do citocromo-c, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo-c-oxidado sofre redução, ocorrendo a oxidação do tetrametil-p-fenilenodiamina, formando-se uma substância de coloração azul. As bactérias do grupo coliforme, por não possuírem o citocromo-c, apresentam resultado negativo neste teste.

3.12 Ágar EAM

Meio seletivo e diferencial, no qual a produção de ácidos pelas bactérias fermentadoras de lactose possibilita a incorporação do corante (eozina-azul de metileno) existente no meio, sendo que as colônias podem ser descritas como típicas (nucleadas, com ou sem brilho metálico), atípicas (colônias sem núcleo), rosas, mucóides ou opacas) ou negativas (todos os outros tipos).

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.¹

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme ($44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. O nível de água no banho-maria deve ser mantido acima do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio imersos para incubação, sendo recomendada a troca semanal dessa água para evitar a proliferação de fungos e outros microrganismos.²

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, cuja condutividade deve ser inferior a $2 \mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa ($1,05 \text{ kgf}/\text{cm}^2$ ou $15 \text{ lb}/\text{pol}^2$), produzindo, em seu interior, uma temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.4.2 Estufa de esterilização

Deve manter a temperatura de ($170 \pm 10^{\circ}\text{C}$) durante o período de esterilização (mínimo de 2 horas).

4.1.5 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em um local onde a temperatura per

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento. Sua aferição deve ser feita periodicamente.

2 Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalos de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou arame galvanizado.

maneira na faixa de 16 a 27°C.

4.1.6 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0, pH = 6,86 ou pH = 9,18).

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para o preparo de meios de cultura.

4.2.2 Frascos para água de diluição

De vidro neutro, borossilicato, ou plástico autoclavável, com tampas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis; devem ter volume suficiente para conter 90 ± 2 mL de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se fizer a agitação.

4.2.3 Frasco para coleta de amostra

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.4 Pipetas

Devem ser de borossilicato, tipo Mohr, para 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão.

4.2.5 Tubos de Durham

De borossilicato ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro de tubo de ensaio em cujo interior serão utilizados.

Nota: Usualmente são empregados tubos de Durham de 7 mm x 4,5 mm e de 5 mm x 4 mm.

4.2.6 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o meio de cultura e o inóculo da amostra.

Nota: Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm e de 12 mm x 120 mm.

4.3 Outros materiais

3 A verificação da temperatura da incubadora deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral), colocados em pontos representativos da mesma, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima em sua parte central.

4.3.1 Algas de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7-8 cm de comprimento, com um aro de 3 mm de diâmetro em uma das extremidades, sendo a outra fixada a um cabo metálico (cabo de Kolle).⁴

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Estantes

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.5 Estojo para pipetas

Usar, para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para esterilização.

4.3.6 Termômetros5 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Nota: Para o preparo de meios de cultura, devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório, a partir de seus componentes específicos, devendo ser utilizadas, para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a.).

5.1 Caldo lauril-triptose com púrpura de bromocresol-C.L.T. (concentração dupla)5.1.1 Fórmula:

Triptose.....	40,0 g
Lactose.....	10,0 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	5,5 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	5,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	10,0 g
Lauril-sulfato de sódio.....	0,2 g

⁴ Opcionalmente ao uso de algas de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. Após o uso, as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e descartadas. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C durante 3 horas.

Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C	

5.1.2 Preparo

Pesar 71,2 g do meio desidratado Caldo lauril-triptose e 0,02 g de púrpura de bromocresol e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.⁵

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.2 Caldo lauril-triptose com púrpura de bromocresol-C.L.T. (concentração simples)

5.2.1 Fórmula:

Triptose.....	20,00 g
Lactose.....	5,00 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	2,75 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	2,75 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,00 g
Lauril-sulfato de sódio.....	0,10 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C	

5.2.2 Preparo

Pesar 35,6 g do meio desidratado Caldo lauril-triptose e 0,01 g de púrpura de bromocresol e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.⁵

⁵ No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e a esterilização não deve exceder duas horas.

5.2.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.3 Caldo lactosado com púrpura de bromocresol-C.L. (concentração dupla)5.3.1 Fórmula:

Extrato de carne.....	6,0 g
Peptona.....	10,0 g
Lactose.....	10,0 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C	

5.3.2 Preparo

Pesar 26,0 g do meio desidratado Caldo lactosado e 0,02 g de púrpura de bromocresol e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.⁶

5.3.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.4 Caldo lactosado com púrpura de bromocresol-C.L. (concentração simples)5.4.1 Fórmula:

Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Lactose.....	5,0 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C	

5.4.2 Preparo

Pesar 13,0 g do meio desidratado Caldo lactosado e 0,01 g de púrpura

⁶ Ver nota de rodapé nº 5.

de bromocresol e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁷

5.4.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.5 Caldo lactosado (C.L.) (concentração simples)

5.5.1 Fórmula:

Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Lactose.....	5,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2 a 25°C	

5.5.2 Preparo

Pesar 13,0 g do meio desidratado Caldo lactosado e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio; tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁷

5.5.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.6 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B.B.)

5.6.1 Fórmula:

Peptona.....	10,0 g
Lactose.....	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	20,0 g
Verde brilhante.....	0,0133 g

⁷ Ver Nota de rodapé nº 5.

Água destilada..... 1 000 mL
 pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C

5.6.2 Preparo

Pesar 40,0 g do meio desidratado Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.⁸

5.6.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.7 Meio EC

5.7.1 Fórmula:

Triptose ou tripticase.....	20,0 g
Lactose.....	5,0 g
Mistura de sais biliares.....	1,5 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	4,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	1,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C	

5.7.2 Preparo

Pesar 37,0 g do meio EC desidratado e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

5.7.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

8 Ver Nota de rodapé nº 5.

5.8 Ágar eosina-azul de metileno (segundo Levine) - EAM

5.8.1 Fórmula:

Peptona.....	10,0 g
Lactose.....	10,0 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	2,0 g
Ágar.....	15,0 g
Eosina.....	0,4
Azul de metileno.....	0,065 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,1 \pm 0,1$ a $25^\circ C$	

5.8.2 Preparo

Pesar 37,5 g do meio desidratado Ágar eosina-azul de metileno e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a $121^\circ C$, durante 15 minutos.⁹Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm.

- Notas:
- Durante a esterilização, poderá ocorrer descoloração do meio, o qual voltará à coloração normal após o resfriamento.
 - Após a autoclavação, pode-se formar um precipitado, o qual deve ser ressuspenso, através de homogeneização lenta do meio no frasco, antes de sua distribuição em placas de Petri.

5.8.3 Armazenamento

Após a solidificação do meio, embrulhar as placas de Petri com papel Kraft e manter em refrigerador (2 a $10^\circ C$) durante, no máximo, uma semana.

5.9 Ágar nutriente

5.9.1 Fórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,1$ a $25^\circ C$	

5.9.2 Preparo

⁹ Ver Nota de rodapé nº 5.

Pesar 23 g do meio desidratado Ágar nutriente e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio ainda estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.9.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.10 Água de diluição

5.10.1 Fórmula:

Solução-estoque A.....	1,25 mL
Solução-estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1 000 mL

5.10.2 Preparo

a) preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.¹⁰

b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1 000 mL com

10 Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

- c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a um litro de água destilada;
- d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 90 ± 2 mL;
- e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos; e
- f) armazenar à temperatura ambiente.

5.11 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.11.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40,0 g
Água recém-destilada.....	1 000 mL

5.11.2 Preparo

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 1 000 mL de água recém-destilada. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

5.12 Reagente para o teste de oxidase

5.12.1 Fórmula:

Cloridrato de N, N, N' N', tetrametil-p-fenilenodiamina...	0,1 g
Água destilada.....	10 mL

5.12.2 Preparo

Pesar 0,1 g de N, N, N', N' - tetrametil-p-fenilenodiamina e acrescentar 10 mL de água destilada. Dissolver e guardar a solução em frasco âmbar, em geladeira (2 a 10°C), durante, no máximo, dois dias.

5.13 Soluções para a coloração de Gram

5.13.1 Solução de cristal violeta

Preparo:

Dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico a 95% e filtrar em papel grosso ou algodão. Dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada. Misturar estas soluções em partes iguais, 24 horas antes do uso, filtrando através de papel de filtro.

5.13.2 Solução de lugol

Preparo:

Dissolver 2 g de iodeto de potássio (KI) em 5 mL de água destilada. Adicionar 1 g de cristais de iodo à solução de iodeto de potássio e agita-la até que o iodo se dissolva. Adicionar água destilada até completar o volume de 300 mL.

5.13.3 Solução de safraninaPreparo:

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico a 95%, preparando-se, assim, a solução-estoque de safranina. No momento do uso, diluir 10 mL dessa solução-estoque em 100 mL de água destilada.

5.13.4 Solução de álcool-acetonaPreparo:

Misturar álcool etílico a 95% e acetona em partes iguais.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO6.1 Princípio do método

A determinação do N.M.P. de coliformes em uma amostra é efetuada a partir de aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas, uniformemente distribuídas na amostra. Consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos, cuja sementeira fornece resultados negativos em pelo menos um tubo da série em que os mesmos foram inoculados e a combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade das bactérias pesquisadas, através da aplicação de cálculos de probabilidade. Para análises de águas, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, usando-se séries de 5 tubos para cada volume a ser inoculado.

6.2 Etapas do método

O exame para determinação de coliformes totais se processa através de 2 etapas (ensaios presuntivo e confirmativo), de realização obrigatória para todos os tipos de amostras de água, as quais são complementadas, quando indicado, por uma terceira etapa (exame comple

to). A densidade de coliformes fecais é obtida a partir de um exame específico, aplicado paralelamente ao teste para confirmação de coliformes totais.

6.2.1 Ensaio presuntivo

Consiste na inoculação de volumes determinados da amostra em séries de tubos de Caldo lauril-triptose ou Caldo lactosado, com púrpura de bromocresol, que são incubados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24-48 horas, ocorrendo um enriquecimento de organismos fermentadores da lactose. A acidificação, com ou sem produção de gás, a partir da fermentação da lactose no meio de cultura empregado nesse ensaio, é prova presuntiva positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme.

6.2.2 Ensaio confirmativo

Consiste na transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo (produção de ácido com ou sem gás em C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol após 24 ou 48 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) para C.L.V.B.B., sendo a incubação efetuada também a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. A produção de gás a partir da fermentação da lactose neste meio é prova confirmativa positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme. Esta etapa do exame reduz a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-positivos, decorrentes da atividade de bactérias esporuladas e de bactérias Gram-positivas fermentadoras da lactose.

6.2.3 Ensaio para diferenciação de coliformes fecais

Consiste na transferência de um inóculo de cada cultura com resultado positivo em C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol incubados durante 24-48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, para tubos contendo o meio E.C., que serão incubados durante 24 ± 2 horas a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria, com agitação e temperatura constantes. O resultado será positivo quando houver produção de gás a partir da fermentação da lactose contida no meio E.C.

6.2.4 Ensaio completo

O ensaio completo inclui, além da realização dos ensaios presuntivo e confirmativo, o isolamento das culturas de bactérias com resultado positivo no C.L.V.B.B., em placas de Ágar E.A.M., para a realização de testes posteriores. Colônias isoladas em Ágar E.A.M. são transferidas para Caldo lactosado e para Ágar nutriente, sendo o crescimento bacteriano neste último meio empregado para a realização do teste de oxidase e da coloração de Gram. O resultado do teste completo será positivo quando houver produção de gás a partir da fermentação da lactose em Caldo lactosado, for comprovado resultado negati

vo no teste de oxidase e for demonstrada, por exame microscópico, a presença de bacilos Gram-negativos, não esporulados, nos esfregaços submetidos à coloração de Gram. A realização do teste completo tem por finalidade eliminar os resultados falsos-positivos que podem ocorrer no C.L.V.B.B., devido à ação sinérgica de bactérias.

6.3 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de coleta e preservação de amostras de água, da CETESB, 1988.

6.3.1 Amostra

6.3.2 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.3.3 Agente neutralizador de cloro residual: para a colheita de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiossulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

6.3.4 Agentes quelantes: para a colheita de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA (pH final=6,5), para cada 100 mL da amostra, além do tiossulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de colheita separadamente, ou já combinada com a solução de tiossulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

6.3.5 Transporte e conservação: após a colheita, a amostra deverá

ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e o início do exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

6.4 Procedimento

6.4.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes da mesma a serem inoculados, em função de sua procedência, segundo especificado a seguir:

- a) para águas de consumo humano é requerida, preferencialmente, a inoculação de 10 porções de 10 mL; entretanto, quando isso não for possível, é permitida, pela legislação vigente, a análise de 5 porções de 10 mL;
- b) para outros tipos de água, a técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, sendo cada volume inoculado em uma série de 5 tubos. A seleção desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de coliformes presentes na amostra ou em dados prévios sobre a mesma), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado com o menor volume selecionado forneça resultado negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável, para amostras desconhecidas, a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.

6.4.2 Realizar o ensaio presuntivo, conforme especificado em 6.4.3 a 6.4.10.

6.4.3 Preparar os tubos de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol, requeridos para o ensaio, conforme definido em 6.4.1, e dispô-los em estantes, em fileiras de 5 tubos.

Nota: Usar C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol em concentração dupla para a inoculação das porções de 10 mL da amostra e, em concentração simples, para os demais volumes.

6.4.4 Proceder à identificação dos tubos, anotando, no primeiro tubo à direita na primeira fileira, o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado em cada um dos tubos das mesmas.

6.4.5 Homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de, aproximadamente, 45° entre o braço e o antebraço.

6.4.6 Com uma pipeta esterilizada de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição, antecipadamente identificado. Prepara-se, assim, a 1ª diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra (ver Figura 1).

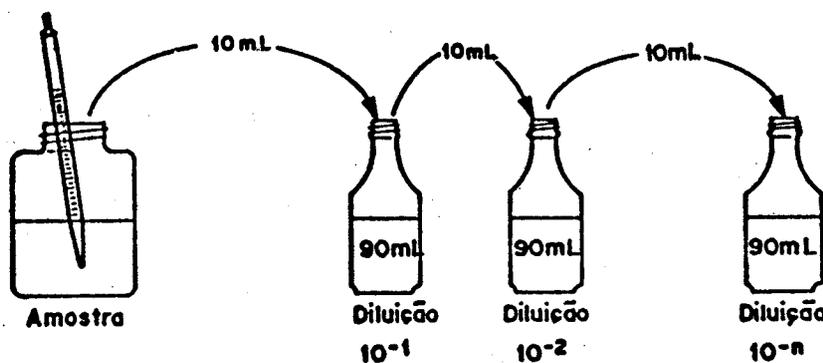


FIGURA 1 - Preparo das diluições decimais

6.4.7 Com a mesma pipeta, semear 10 mL da amostra em cada um dos tubos de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol em concentração dupla, quando este volume for requerido para o teste (ver Figura 2).

6.4.8 Desprezar a pipeta de 10 mL e, com uma pipeta de 5 mL, inocular 1 mL da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo.

6.4.9 Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição (10^{-1}) como em 6.4.5 e, com uma nova pipeta esterilizada, transferir 10 mL para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,01 mL da amostra.

6.4.10 Proceder dessa maneira na seqüência de diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 10^{-n}).

Nota: A Figura 1 sumariza o procedimento relativo ao preparo das diluições decimais seriadas.

6.4.11 Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo seqüência decrescente das mesmas (da maior para a menor diluição efetuada).

6.4.12 Agitar vigorosamente, 25 vezes, o frasco com a última diluição efetuada e, com uma pipeta estéril de 5 mL, inocular 1 mL da diluição em cada um dos tubos de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromo cresol em concentração simples, correspondentes a essa diluição.

6.4.13 Proceder dessa maneira, semeando de trás para frente, sempre com a mesma pipeta, da maior para a menor diluição.

Nota: A Figura 2 sumariza o procedimento relativo à inoculação dos volumes da amostra e das suas diluições decimais.

6.4.14 Após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o ensaio, colocar a estante, contendo os tubos inoculados, em incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 ± 2 horas.

6.4.15 Após esse período de incubação, retirar a estante com os tubos da incubadora, para efetuar a leitura dos resultados. Para isso, agitar delicadamente cada tubo e examiná-lo quando à acidificação do meio (evidenciada pela coloração amarela do mesmo) e produção de gás.

6.4.16 Transferir, para outra estante, os tubos com resultados positivos (acidificação do meio, com ou sem produção de gás), mantendo em fileiras sequenciais os tubos positivos correspondentes a cada volume inoculado.

Nota: Essas culturas com resultado presuntivo positivo são encaminhadas ao ensaio para confirmação de coliformes totais (item 6.4.20) e para diferenciação de coliformes fecais (item 6.4.21) imediatamente após a leitura dos resultados.

6.4.17 Registrar os resultados, anotando o número de tubos com resultado positivo para cada volume inoculado.

6.4.18 Retornar à incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ os tubos com resultados negativos, por um período adicional de 24 ± 1 hora.

6.4.19 Após esse período, efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), segundo descrito em 6.4.15, separando os tubos com resultado positivo (conforme especificado em 6.4.16) - para realização dos ensaios para confirmação de coliformes totais e para diferenciação de coliformes fecais - e descartando, agora, os tubos com resultados negativos.

6.4.20 Com todas as culturas, que apresentaram resultado presuntivo positivo em 24 ± 2 h e 48 ± 3 horas, realizar o ensaio confirmativo conforme descrito em 6.4.20.1 a 6.4.20.4, imediatamente após as respectivas leituras.

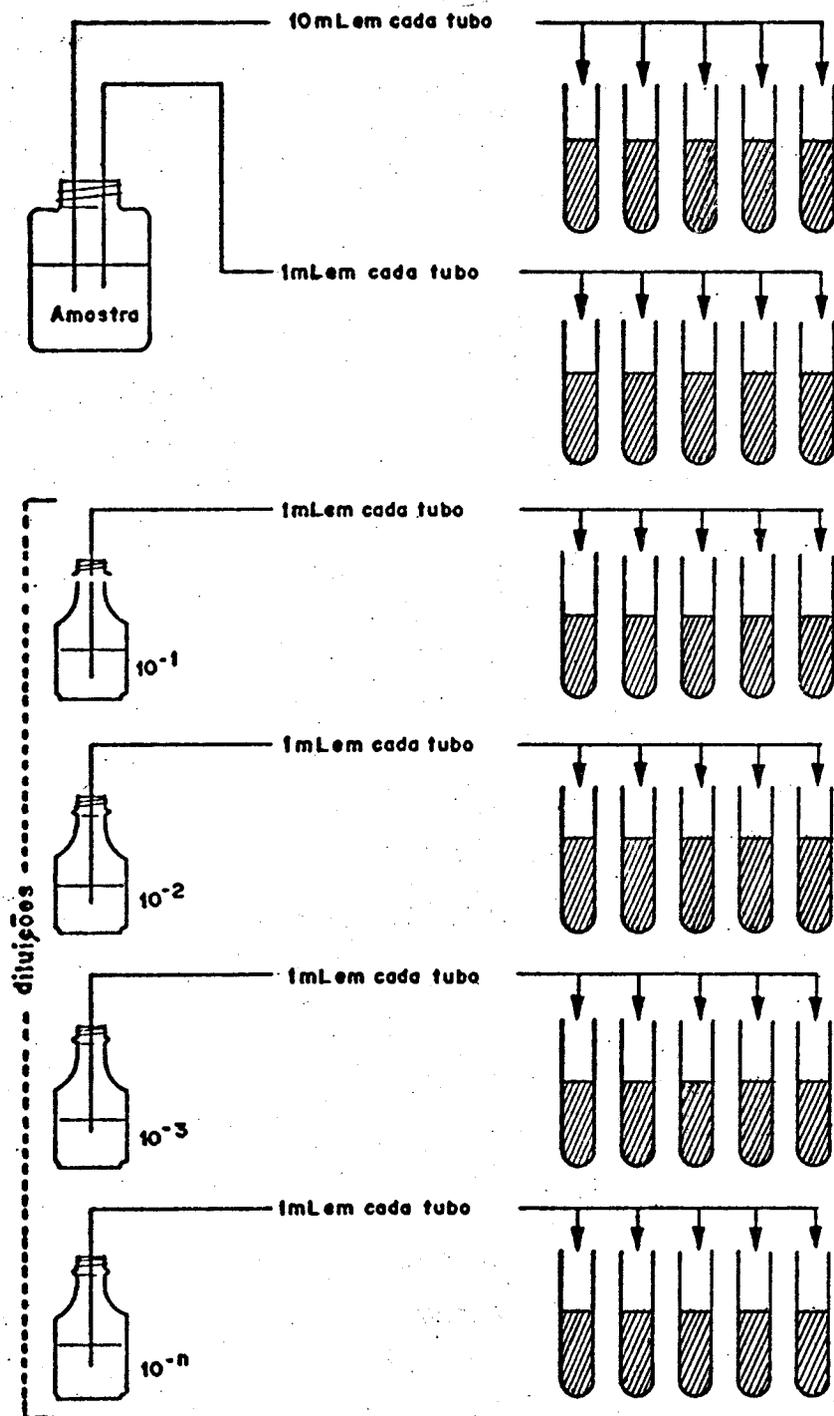


FIGURA 2 - Ensaio presuntivo - Inoculação dos volumes da amostra e suas diluições decimais

Nota: Como procedimento alternativo, quando vários volumes inoculados derem resultados positivos, pode-se efetuar a confirmação somente da última série de tubos correspondentes ao menor volume inoculado que apresentou resultados positivos em todos os tubos em 24 ± 2 h e os tubos positivos das séries seguintes. Desprezar as séries antecedentes de tubos com resultados

positivos, considerando, para as mesmas, resultado confirmativo positivo. Todas as culturas com resultado presuntivo positivo em 48 ± 3 h são encaminhadas à confirmação. Este procedimento alternativo só é aplicável para amostras de águas poluídas e residuárias, em relação às quais se tem comprovação anterior consistente sobre a confirmação dos resultados presuntivos positivos.

6.4.20.1 Marcar tubos de C.L.V.B.B., correspondentes, respectivamente, a cada tubo de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol, com resultado presuntivo positivo (acidificação, com ou sem produção de gás).

6.4.20.2 Agitar bem cada tubo de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol com resultado presuntivo positivo e, com uma alça de inoculação ou haste de madeira estéril, retirar o material e inocular no tubo de C.L.V.B.B. correspondente, evitando a película superficial que pode se formar no meio presuntivo positivo.

6.4.20.3 Incubar todos os tubos de C.L.V.B.B. inoculados, durante 48 ± 3 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6.4.20.4 Efetuar a leitura após 48 ± 3 horas, considerando teste confirmativo positivo para coliformes totais todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de Durham invertido. Anotar os resultados e calcular o NMP a partir dos dados obtidos.

6.4.21 Paralelamente à realização do ensaio para confirmação de coliformes totais, efetuar o ensaio para diferenciação de coliformes fecais (conforme descrito em 6.4.21.1 a 6.4.21.5) com todas as culturas que apresentaram resultado presuntivo positivo em 24 ± 2 h e 48 ± 3 h.

6.4.21.1 Efetuar a marcação de tubos de E.C. (previamente mantidos em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante, no mínimo, 30 minutos) com os números correspondentes a cada tubo de meio presuntivo (C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol) em que se verificou acidificação, com ou sem formação de gás.

6.4.21.2 Agitar bem cada tubo positivo de C.L.T. ou C.L. com púrpura de bromocresol e, com uma alça de inoculação ou haste de madeira estéril, colher um inóculo da cultura e transferi-lo para o tubo de E.C. correspondente, evitando a película superficial que pode se formar na cultura presuntiva positiva.

6.4.21.3 Incubar todos os tubos de E.C. inoculados, no máximo até

30 minutos após a inoculação, em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

6.4.21.4 Efetuar a leitura, considerando, como resultado positivo para o teste, todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de Durham.

6.4.21.5 Com os dados obtidos, calcular o NMP de coliformes fecais.

6.5 Ensaio completo

Notas: a) A aplicação do teste completo é recomendada especificamente para amostras de águas destinadas a consumo humano (tratadas ou brutas), para comprovar definitivamente a ocorrência de coliformes totais, visto que a presença destas bactérias na água pode impugnar sua utilização para essa finalidade:

b) Este teste é recomendado também como um procedimento de controle de qualidade analítica, devendo ser aplicado a, no mínimo, 10% das amostras analisadas que apresentaram resultado positivo no ensaio confirmativo.

c) As culturas que apresentaram resultados positivos tanto no C.L.V.B.B. como no meio E.C. não requerem a aplicação deste teste.

d) A coloração de Gram e o teste de oxidase não são de realização obrigatória no exame completo para amostras de águas potáveis, visto não ser freqüente, nesse tipo de água, a ocorrência de bactérias Gram-positivas e organismos formadores de esporos que conseguem sobreviver ao procedimento seletivo de triagem.

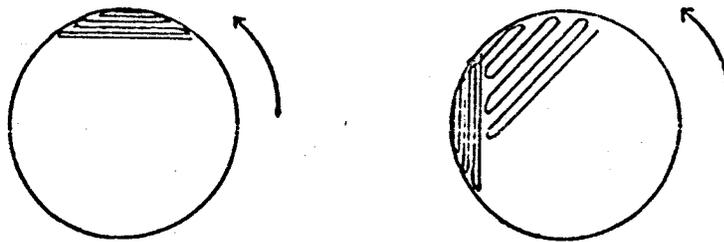
6.5.1 Se a finalidade do exame for o ensaio completo, prosseguir apenas com as culturas com resultado positivo em C.L.V.B.B. e que apresentaram resultado negativo no meio E.C.

6.5.2 Identificar placas de Ágar EAM, correspondendo, cada uma, a um tubo de C.L.V.B.B com resultado positivo.

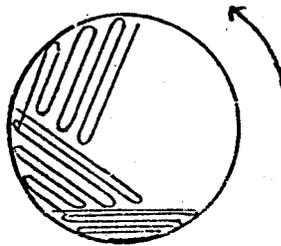
6.5.3 Flambar e resfriar uma alça de inoculação de platina ou níquel-cromo, com um aro de 3 mm de diâmetro em sua extremidade.

6.5.4 Agitar e inclinar o tubo de C.L.V.B.B e mergulhar a extremidade da alça de inoculação no líquido do tubo a uma profundidade de, aproximadamente, 1 cm, para colher um inóculo da cultura.

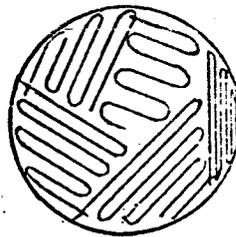
- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de Ágar EAM, girá-la e iniciar seu espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando rachá-lo;



- b) girar novamente a placa e continuar o espalhamento no 2º quadrante;



- c) proceder dessa maneira até completar a sementeira em toda a superfície do ágar.



6.5.5 Fechar e incubar a placa em posição invertida durante 24 ± 2 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6.5.6 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura, considerando como típicas de coliformes as colônias nucleadas, com ou sem brilho metálico; considerar como colônias atípicas de coliformes as colônias róseas, mucóides, opacas e sem núcleo e, como co

lônias negativas, todos os outros tipos.

6.5.7 Selecionar 3 colônias isoladas, escolhendo 2 colônias típicas e 1 atípica, e semear, com auxílio de uma alça de inoculação, cada uma delas em um tubo de Caldo lactosado e em um tubo de Ágar nutriente inclinado.

6.5.8 Incubar o Caldo lactosado durante 24-48 horas e o Ágar nutriente inclinado durante 18-24 h, ambos a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6.5.9 A partir das culturas em Ágar nutriente inclinado, correspondentes a colônias que apresentaram resultado positivo no Caldo lactosado (produção de gás), efetuar o teste para pesquisa da oxidase e preparar o esfregaço para a coloração de Gram.

a) teste para pesquisa da oxidase: com uma alça de inoculação de platina, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento em Ágar nutriente e tocar uma folha de papel de filtro, previamente colocada no fundo de uma placa de Petri estéril e embebida em solução de cloridrato de N-N-N'-N'-tetrametil-p-fenilenodiamina. A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul intensa em aproximadamente 30 segundos, no local em que foi depositada a cultura. Se nenhuma ou discreta reação se desenvolver no período de dois minutos de observação, considera-se como prova negativa. Os coliformes não possuem a enzima citocromo-oxidase, sendo esperada, portanto, resposta negativa neste teste. Para a realização do teste, usar sempre, como controle positivo, uma cultura oxidase-positiva (Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila) e uma cultura oxidase-negativa (Escherichia coli);

b) Coloração de Gram:

b.1 Preparação do esfregaço:

- limpar bem uma lâmina de vidro, para livrá-la de qualquer traço de película oleosa;
- colocar uma gota de água destilada sobre a lâmina;
- com uma alça de inoculação, colher uma pequena quantidade de crescimento bacteriano na superfície do Ágar nutriente inclinado e suspendê-la na gota de água destilada;
- com a ponta da alça de inoculação, espalhar sobre

a lâmina. de modo a formar uma película bem fina;
- fixar o esfregaço, passando a lâmina 3 vezes sobre uma chama.

b.2 Coloração de Gram: Para a coloração pelo método de Gram, proceder da seguinte forma:

- cobrir o esfregaço durante 1 minuto com solução de cristal violeta;
- remover o excesso da solução de cristal violeta da lâmina, lavando-a levemente com água corrente;
- cobrir o esfregaço com solução de lugol durante 1 minuto;
- descorar o esfregaço, usando uma solução de álcool-acetona (1:1);
- cobrir o esfregaço, durante 15 segundos, com solução de safranina, diluída segundo item 5.13.3;
- lavar a lâmina em água corrente e enxugá-la delicadamente com papel filtro, através de leve compressão do mesmo sobre a lâmina.

6.5.10 Examinar as lâminas ao microscópio, usando objetiva de imersão. As bactérias coliformes são bacilos não esporulados, Gram-negativos (corados em rosa) e podem aparecer aos pares ou raramente em pequenas cadeias.

6.5.11 Para cada tubo de C.L.V.B.B. submetido ao teste completo, é considerado resultado positivo para a presença de coliformes neste teste, se pelo menos uma das 3 colônias isoladas no Ágar EAM apresentar produção de gás no Caldo lactosado, resposta negativa para o teste de oxidase e for demonstrada a presença de bacilos Gram-negativos não esporulados na coloração de Gram correspondente. Para o cálculo do NMP, considerar o nº de tubos C.L.V.B.B., cuja positividade foi comprovada através dos resultados do teste completo.

Nota: O esquema do procedimento completo é apresentado na Figura 3.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo do número mais provável (NMP/100 mL)

7.1.1 A densidade de coliformes é expressa como NMP de coliformes por 100 mL, o qual é obtido através de tabelas, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

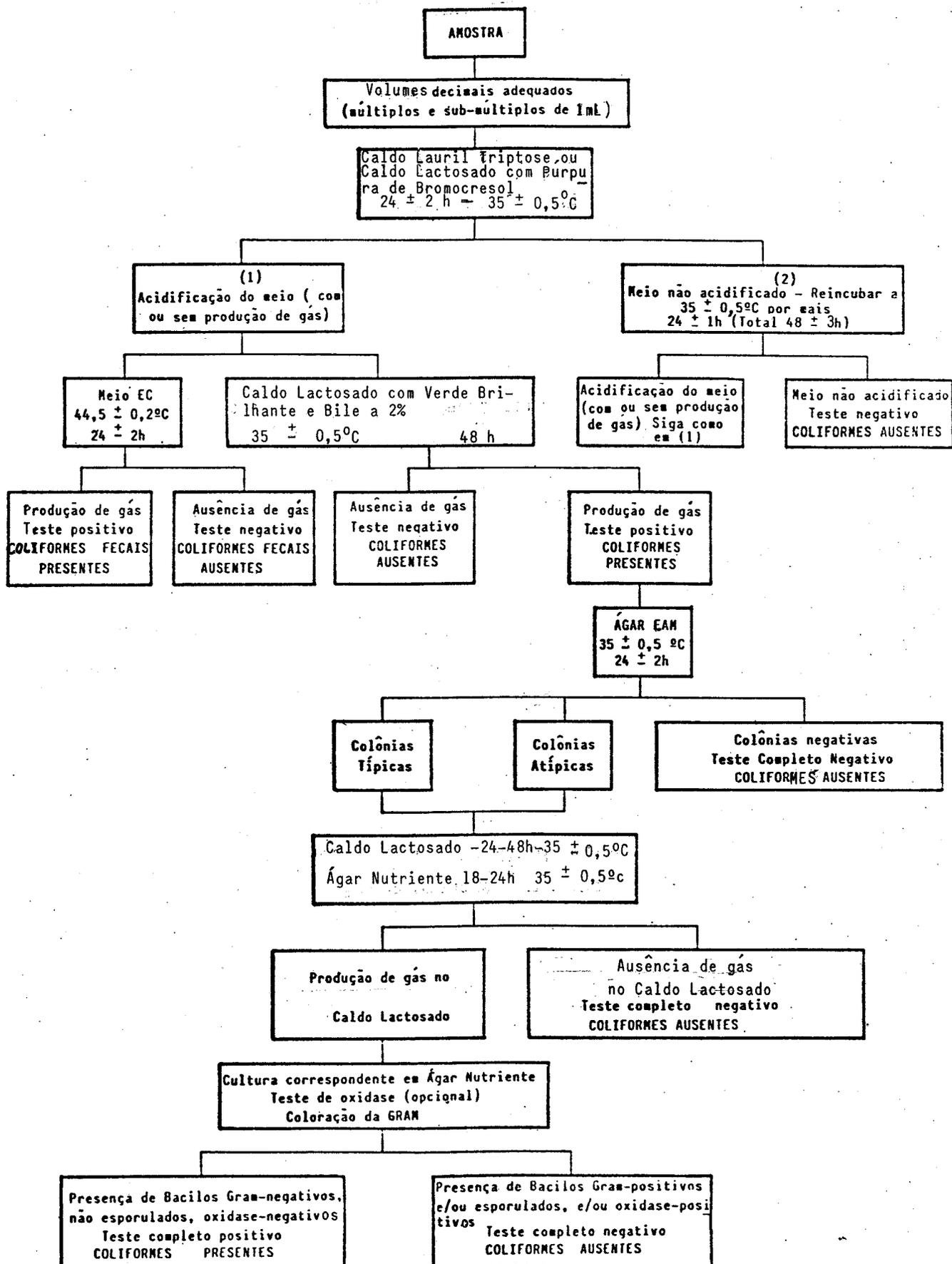


FIGURA 3 - Esquema do procedimento para determinação de coliformes totais e fecais pela técnica de tubos múltiplos

7.1.2 A Tabela 1 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 5 porções de 10 mL da amostra.

TABELA 1 - Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas 5 porções de 10 mL da amostra

Número de tubos com reação positiva, a partir de 5 tubos de 10 mL	Índice de NMP 100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
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

7.1.3 A Tabela 2 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 10 porções de 10 mL da amostra.

TABELA 2 - Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são inoculadas 10 porções de 10 mL da amostra

Número de tubos com reação positiva, a partir de 10 tubos de 10 mL	Índice de NMP 100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	> 23,0	13,5	Infinito

7.1.4 A Tabela 3 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas 5 porções de 10 mL, 5 porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL da amostra. Embora os volumes indicados se refiram mais especificamente a amostras de águas pouco poluídas, esta Tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de coliformes totais, o código é composto a partir dos tubos com resultado positivo no meio C.L.V.B.B. (ensaio confirmado) ou, no caso de ter sido efetuado o exame completo, a partir do número de tubos de C.L.V.B.B., em relação aos quais a positividade dos resultados foi confirmada através de testes adicionais (coloração de Gram negativa, teste negativo para oxidase e produção de gás em Caldo lactosado pelas colônias isoladas de cada tubo de C.L.V.B.B. com resultado positivo no ensaio confirmativo). Para a determinação do NMP de coliformes fecais, o código é composto a partir dos resultados obtidos no meio E.C.

7.1.5 Utilização da Tabela 3

7.1.5.1 Quando são inoculadas apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados os volumes indicados na Tabela (10 mL, 1 mL e 0,1 mL): Neste caso, o NMP é obtido diretamente a partir da Tabela 3. Para isto, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente. Considerem-se os exemplos que se seguem na Tabela 4, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

7.1.5.2 Quando são inoculadas apenas três séries de 5 tubos, sendo utilizados volumes decimais diferentes daqueles indicados na Tabela 3: Neste caso, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor do NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

Considerem-se os seguintes exemplos (vide Tabela 5).

7.1.5.3 Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados: Neste caso, para a composição do código, são utilizados apenas os resulta

dos positivos correspondentes a três séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subseqüentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontrando-se o código na Tabela e o NMP a ele correspondente, o valor final do NMP é obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

Valor do NMP correspondente ao código x $\frac{10}{\text{maior volume inoculado selecionado para compor o código}}$

Exemplos (vide Tabela 6).

7.1.5.4 Casos especiais

- a) se menos que três das diluições inoculadas apresentam resultados positivos, para a composição do código são selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver Exemplo 1 da Tabela 7);
- b) se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao nº de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver Exemplo 2 da Tabela 7);
- c) embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores àqueles selecionados para a formação do código, se isto ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultado positivo nos cinco tubos, seguido do nº de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver Exemplo 3 da Tabela 7);
- d) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar para a composição do código, as três maiores diluições (ver Exemplo 4 da Tabela 7);
- e) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar para a formação do código, as três menores diluições (ver Exemplo 5 da Tabela 7).

7.2 Expressão dos resultados

Tabela 3 - Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL em séries de 5 tubos

Número de tubos com reação positiva quando são utilizados, em séries de 5 tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100mL	Limites de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	29
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	> 1600	-	-

7.2.1 Os resultados são expressos como:

- a) NMP/100 mL de coliformes totais; e
- b) NMP/100 mL de coliformes fecais.

/TABELAS 4, 5 e 6

TABELA 4 - Exemplos

Exemplos	Números de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:			Código (Combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100 mL
	10 mL	1 mL	0,1 mL		
1	5	2	0	520	50
2	4	2	0	420	22
3	5	5	1	551	300
4	5	5	5	555	> 1 600

Tabela 5 - Exemplos

Volumen decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código	NMP cor- respon- dente ao còdi- go	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	100 mL	10 mL	1(10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL				
100-10-1	5	4	0					540	130	$130 \times \frac{10}{100}$	13
10 ⁰ a 10 ⁻²			5	0	0			500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 ⁻¹ a 10 ⁻³				4	1	0		410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 ⁻² a 10 ⁻⁴					3	0	0	300	8	$8 \times \frac{10}{0,01}$	8000

Tabela 6 - Exemplos

Volumen decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:								Código seleccio- nado	NMP cor- respon- dente ao código	Cálculo do NMP	NMP / 100 mL
	10 mL	10 ⁰ mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL	10 ⁻⁶ mL				
10 a 10 ⁻²	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	-	-	-	-	531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1,1 x 10 ³
10 ⁰ a 10 ⁻⁴	-	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	-	-	521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7,0 x 10 ³
10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	-	-	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	-	520	50	$50 \times \frac{10}{0,001}$	5,0 x 10 ⁵
10 ⁻² a 10 ⁻⁶	-	-	-	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 ⁵

Obs: Números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

/TABELA 7

TABELA 7 - Exemplos

Exemplos	Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos, em cada serie de 5 tubos, inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP / 100 mL
		10 mL	1 (10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL				
1	10 ⁰ - 10 ⁻³	///	4	1	0	0	///	///	410	17	17 x $\frac{10}{1}$	170
2	10 ⁰ - 10 ⁻⁵	///	5	5	4	1	1	0	542	220	220 x $\frac{10}{0,1}$	2,2 x 10 ⁴
3	10 ¹ - 10 ⁻⁴	4	5	4	0	0	0	///	540	130	130 x $\frac{10}{1}$	1,3 x 10 ³
4	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁵	///	///	5	5	5	5	5	555	>1600	>1600 x $\frac{10}{0,001}$	>1,6 x 10 ⁷
5	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁵	///	///	0	0	0	0	0	000	< 2	< 2 x $\frac{10}{0,1}$	< 200

ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARESA-1 Ensaio presuntivo: concentração dos meios de cultura

Os meios de cultura, empregados no ensaio presuntivo (Caldo lactosado ou Caldo lauril-triptose com púrpura de bromocresol), devem ser preparados em concentração adequada para que a adição de porções de 10 mL, ou mais, da amostra não determine uma redução na concentração dos ingredientes. Para isso deve-se observar as orientações apresentadas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Preparo do caldo lactosado com púrpura de bromocresol

Volume da amostra a ser inoculada (mL)	Volume do meio de cultura no tubo (mL)	Volume do meio de cultura + inóculo (mL)	Quantidade requerida do meio desidratado "Lactose Broth" (g/L)
1	10 ou mais	11 ou mais	13,0
10	10	20	26,0
10	20	30	19,5
100	50	150	39,0
100	35	135	50,1
100	20	120	78,0

Tabela 9 - Preparo do caldo lauril-triptose com púrpura de bromocresol

Volume da amostra a ser inoculada (mL)	Volume do meio de cultura no tubo (mL)	Volume do meio de cultura + inóculo (mL)	Quantidade requerida do meio desidratado "Lauril-Triptose Broth" (g/L)
1	10 ou mais	11 ou mais	36,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

A-2 Indicação dos ensaios de colimetria

- a) Ensaio presuntivo: é requerido como primeira etapa do teste para determinação do NMP de coliformes em todos os tipos de amostra. Antigamente, era utilizado como única etapa para o exame de amostras de corpos receptores de esgoto e para se estabelecer o tratamento de águas brutas, mas, atualmente, exige-se também a realização do ensaio confirmativo;

- b) ensaio confirmativo: a realização deste ensaio, em cont
nuidade ao ensaio presuntivo, é requerida para todos os ti
pos de água, na determinação do NMP de coliformes;
- c) diferenciação para coliformes fecais: é aplicada na inves
tigação da poluição de corpos de água, tratamento de esgo
tos, águas para recreação e, juntamente com o grupo colifor
me, para monitoramento de águas tratadas.

A-3 Cuidados especiais com a vidraria

Ver Norma CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de mate
riais em laboratórios de microbiologia.

A-4 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e
soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas
ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e cre
scimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua
qualidade, através da realização de testes específicos. Ver Norma
CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos.

A-5 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e
controle de qualidade dos meios de cultura a serem empregados no
teste para determinação do NMP de coliformes. Ver Norma CETESB L5.216
- Controle de qualidade de meios de cultura.

A-6 Técnica de tubos múltiplos - Avaliação dos resultados

Os diferentes códigos correspondentes às combinações de resultados
positivos e negativos, empregados para o cálculo do NMP, têm dife
rentes expectativas de ocorrência e a análise dos códigos obtidos no
laboratório fornece informações sobre a precisão dos técnicos na exe
cução da análise e adequação da técnica ao tipo de amostra de água
analisada. Ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de
análises bacteriológicas de água.

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989.
- B-2 BORDNER, R. & WINTER, J. ed. Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, 1978, 338p. (EPA/600/8-78-017).
- B-3 CETESB. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1989 (Norma Técnica L5.010, 1ª revisão).
- B-4 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216, 1ª revisão).
- B-5 _____. Guia de coleta e preservação de amostras de água, da CETESB, São Paulo, 1988.
- B-6 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1ª revisão).
- B-7 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).
- B-8 GELDREICH, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2 ed. U.S. Environmental Protection Agency, 1975, 195p. (EPA/670/9-75-006).
-