

RELATÓRIO TÉCNICO

**TESTE BACTERIOLÓGICO COMPARATIVO
COM OS SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS
DEFINIDOS COLILERT, COLISURE E QF-COLI
PARA DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E
E.COLI EM AMOSTRAS DE ÁGUA BRUTA E
TRATADA**

TESTE BACTERIOLÓGICO COMPARATIVO COM OS SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS DEFINIDOS COLILERT, COLISURE E QF-COLI PARA DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E E.COLI EM AMOSTRAS DE ÁGUA BRUTA E TRATADA

INTRODUÇÃO

A água disponível em mananciais, para tratamento e posterior consumo humano, pode conter micro-organismos patogênicos, tornando fundamental a avaliação da sua qualidade microbiológica.

Devido ao fato de ser mais difícil identificar os patógenos presentes na água, dá-se preferência para análise dos microrganismos indicadores de contaminação, tais como as bactérias do grupo coliforme (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A análise deste grupo de microrganismos é a mais importante na classificação de uma amostra em potável ou não (RIEDEL, 1992). As bactérias coliformes ocorrem normalmente no intestino humano e de outros animais de sangue quente e são expelidas em grande quantidade através das fezes humanas e de animais (SILVA et al., 2005).

O grupo coliforme inclui todos os bacilos aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose com produção de gás dentro de no máximo 48 horas, a 35°C (AWWA,1970).

As densidades de bactérias do grupo coliforme e *E. coli* são usadas para avaliar o grau de poluição e a qualidade sanitária da água. Esses resultados têm sido utilizados como padrões para a qualidade bacteriológica de água (HUNT; RICE, 2005).

Assim, é de extrema importância uma metodologia segura e precisa para identificação das bactérias do grupo coliforme.

Métodos rápidos

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo 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 20ª 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 b-D-galactosidase, que indica a presença de coliformes totais, e de b-D-glucoronidase, que indica a presença de *E. coli* (SILVA et al., 2000).

O uso das Técnicas dos Substratos Cromogênicos Definido, permite a verificação da presença ou ausência (P/A) do grupo coliforme total - indicativo de poluição como também da bactéria *Escherichia coli* - indicativo de contaminação fecal na 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.

OBJETIVO

O presente trabalho visa comparar diferentes meios de cultura (Colilert/IDEXX, Colisure/IDEXX e QF-Coli/Quimaflex) para determinação de coliformes totais e fecais (E-coli), seguindo as metodologias do teste rápido tipo P/A (presença/ausência) e do teste rápido por tubos múltiplos.

A vantagem do uso de métodos rápidos, com resultados em 24 horas, comparada ao método tradicional de fermentação em tubos múltiplos, segundo Greig (2005), é que este segundo é muito trabalhoso, e envolve grandes quantidades de meios de cultura, vidrarias, repiques e

necessita de um longo tempo de incubação (até 96 horas para a enumeração de coliformes totais e fecais).

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

1. COLILERT

A detecção e identificação dos coliformes totais e de *Escherichia coli* pela Técnica do Cromogênico Enzimático Colilert(IDEXX) 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.

À medida que os **coliformes** crescem no teste Colilert, eles usam β -galactosidase para metabolizar ONPG e mudam sua cor de incolor para amarelo.

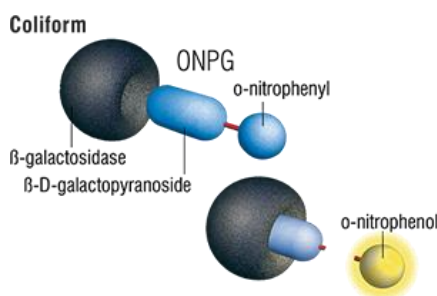


Figura 1: Reação com a presença de Coliformes Totais com COLILERT

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-glucuronídeo (MUG); quando o MUG é degradado, o produto resultante 4-metilumbeliferona, conforme figura a seguir, apresenta fluorescência azul sob luz ultravioleta ($\lambda=360\text{nm}$) (COVERT et al., 1989; SILVA et al., 2000).

Nesta técnica, a presença de coliformes fecais é confirmada pela alteração da **Fluorescência** = *E.*

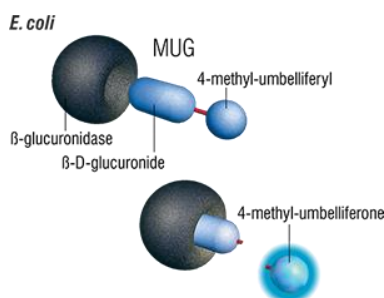


Figura 2: Reação com a presença de E. coli com COLILERT

Esta abordagem é diferente dos meios tradicionais, que proporcionam um ambiente rico em nutrientes que favorecem o crescimento de organismos classificados como alvo e não alvo. Quando os organismos não alvo crescem e imitam os organismos classificados como alvo, ocorrem falso positivos. O crescimento de organismos não alvo também pode suprimir os organismos alvo e originar falso negativos nos meios tradicionais. Para suprimir organismos não alvo, os meios tradicionais incluem frequentemente elevados níveis de sais, detergentes ou outros agentes seletivos que podem inadvertidamente suprimir os organismos alvo e originar falso negativos, o que diminuí a eficiência e precisão de outros meios de cultura similares.

2. COLISURE

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

A presença de *Escherichia coli* é detectada pela fluorescência azul do meio sob luz ultravioleta ($\lambda=360$ nm); 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 (APHA, 1998).

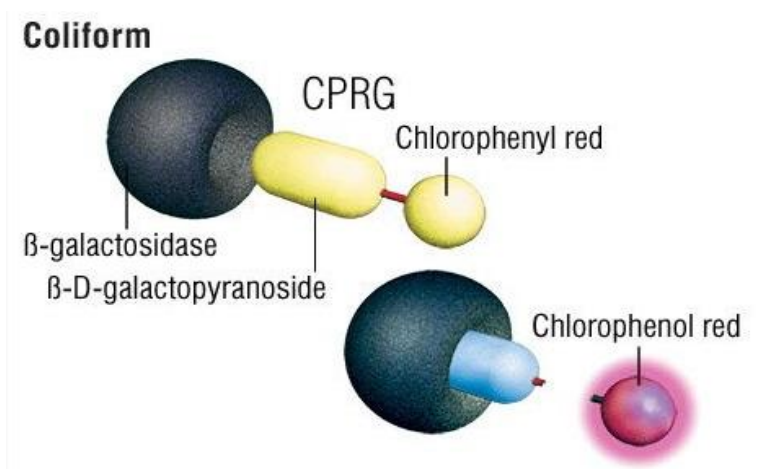


Figura 3: Reação com a presença de Coliformes Totais com COLISURE

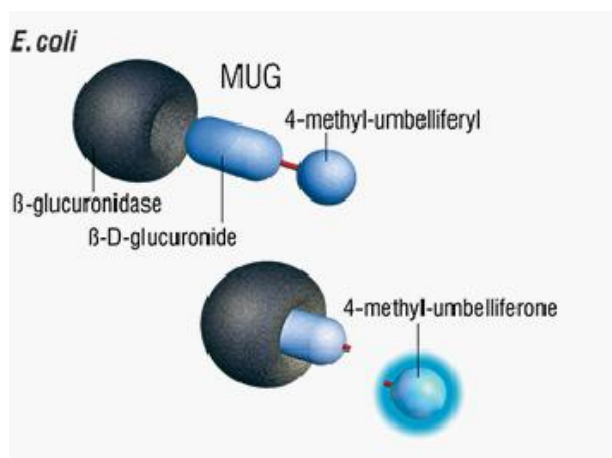


Figura 4: Reação com a presença de E. coli com COLISURE

3. QF-COLI

Substrato de fabricação nacional, pela empresa QUIMAFLEX, e se baseia também na tecnologia ONPG/MUG

METODOLOGIA

A. Teste Qualitativo P/A

Para teste qualitativo, foram coletadas 03 (três) amostras de 100 mL de água tratada na ETA, no ponto usual de coleta (saída do sistema), e em cada uma delas, foi adicionado um flaconete de cada um dos produtos.

Todas as amostras deram ausência de coliformes e de E. Coli após 24 horas de incubação.

B. Teste quantitativo – Tubos Múltiplos:

- Para preparo do meio de cultura, dissolveu-se 3 flaconetes de cada meio de cultura em 300 mL de água deionizada e esterilizada por autoclave à 120 °C, 1kgf/cm² por 20 minutos, na presença da chama do bico de Bunsen.
- Para cada caldo preparado (cada um dos meios de cultura), foram preparados 15 tubos, com adição de 15 mL distribuídos em 3 grupos de 5 tubos de ensaio (previamente limpos e autoclavados), respectivamente classificados para porções de 0,1, 0,01 e 0,001 mL de amostra.
- Em cada grupo de tubo (contendo o meio de cultura) adicionou-se alíquotas de amostra de água bruta de acordo com a sua classificação. Lembrando que para alíquotas menores que 0,1 mL, foi utilizado a amostra diluída em 1:100.

- Realizou-se a transferência da amostra com auxílio de pipetas volumétricas previamente limpas e esterilizadas, sendo que todo o processo foi realizado na presença da chama do bico de Bunsen.
- Após execução da etapa descrita os tubos foram levados para incubação em estufa bacteriológica à 35°C durante 24 horas.

O mesmo processo foi realizado, **com única amostra** de água bruta, com os substratos cromogênicos definidos COLILERT e COLISURE, fabricados pela empresa Norte Americana IDEXX, e, com o substrato QF-Coli da empresa nacional QUIMAFLEX.

As imagens a seguir, apresentam os procedimentos de preparo dos tubos e início da incubação:



Foto 1: Preparo dos tubos com COLILERT



Foto 2: Preparo dos tubos com COLISURE



Foto 3: Preparo dos tubos com QF-COLI

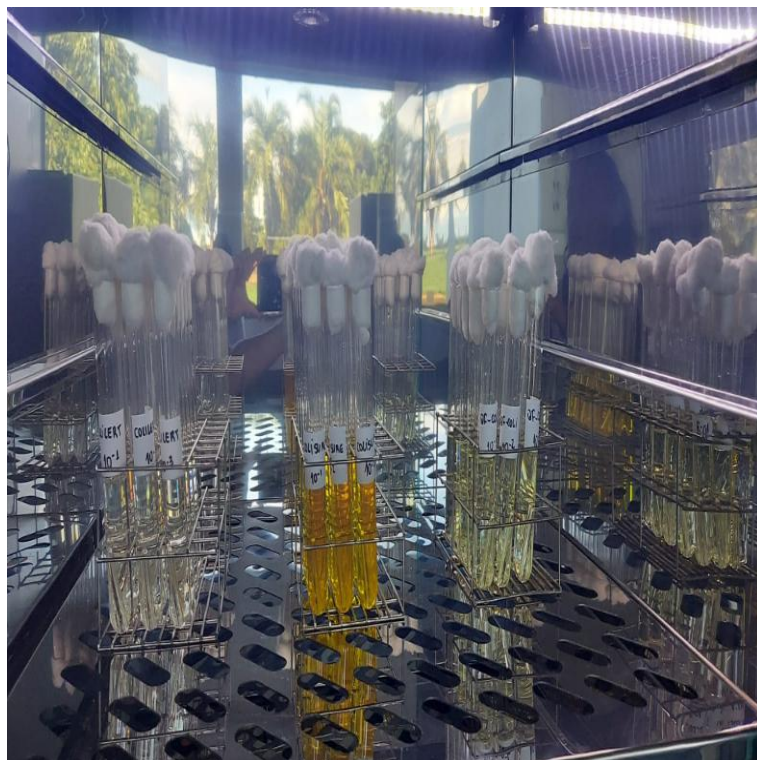


Foto 4: Tubos contendo a amostra e na estufa bacteriológica,
Temperatura à 35°C (início da incubação)

RESULTADOS

Após o período de incubação (mínimo de 18 horas e máximo de 24 horas), foi realizada a leitura dos tubos, através da mudança de coloração.

A quantificação do número mais provável (NMP) de coliformes totais presentes em 100 mililitros de amostra, é obtido através da tabela de NMP (Anexo I), contando para cada 5 tubos na mesma diluição, quantos apresentaram alteração de coloração.

Os resultados estão demonstrados nas tabelas a seguir:

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da variação de coloração nos tubos inoculados com COLILERT (IDEXX)

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	NMP
Col. Totais	5	4	0	13.000
E. coli	0	0	0	0

Tabela 2: Resultados obtidos a partir da variação de coloração nos tubos inoculados com COLISURE (IDEXX)

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	NMP
Col. Totais	5	2	0	4.900
E. coli	1	1	0	400

Tabela 3: Resultados obtidos a partir da variação de coloração nos tubos inoculados com QF-COLI (QUIMAFLEX):

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	NMP
Col. Totais	3	1	0	1.100
E. coli	Resultado ambíguo	0	0	?

Pode-se observar nas Fotos 5 e 6, os tubos ainda na estufa, após incubação de 18 e 24 horas, a temperatura constante de $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

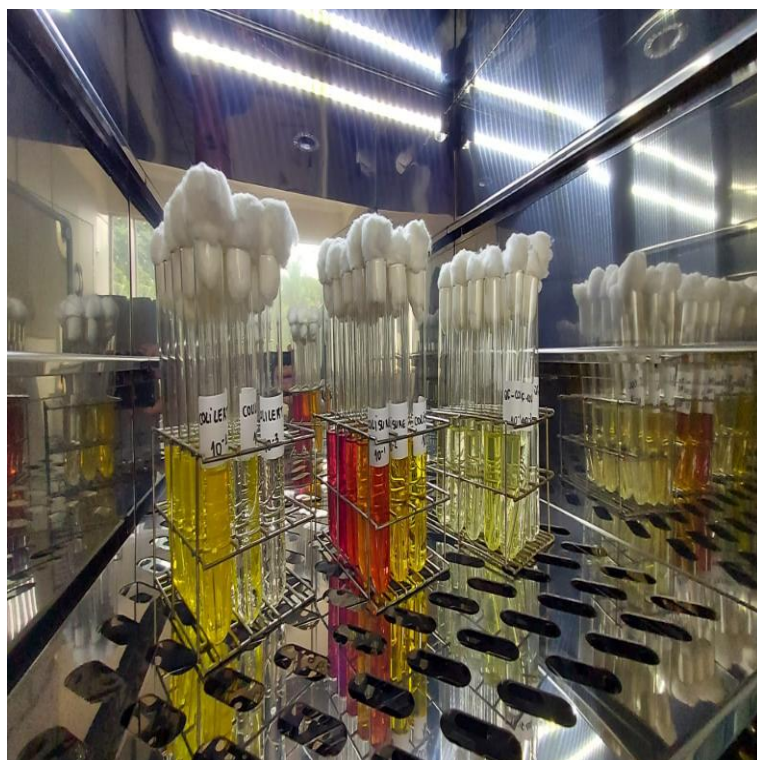


Foto 5: Tubos na estufa, após 18 horas de incubação.

Da esquerda à direita: COLILERT, COLISURE e QF-COLI



Foto 6: Tubos na estufa, após 24 horas de incubação

Da esquerda à direita: COLILERT, COLISURE e QF-COLI

Na Foto 7, observa-se todos os tubos na bancada, após 24 horas de incubação, para contagem dos tubos positivos, indicando presença de coliformes fecais, através da mudança de coloração:

COLILERT – De amarelo pálido → para amarelo intenso

COLISURE – De amarelo → para magenta

QF-Coli – De amarelo pálido → para amarelo



Foto 7: Tubos na bancada, após 24 horas de incubação

Da esquerda à direita: COLISURE, COLILERT e QF-COLI

Nas Fotos 8, 9, 10 e 11, observa-se, a presença de fluorescência na presença de Luz UV no comprimento de onda específico ($\lambda = 360$ nm).

Cada um dos meios de cultura testados apresentou resultado diferente, com relação a facilidade de observância da fluorescência, ponto principal a ser considerado, pois a partir desta interpretação, é possível discorrer sobre a precisão e eficiência dos diferentes meios de cultura testados.

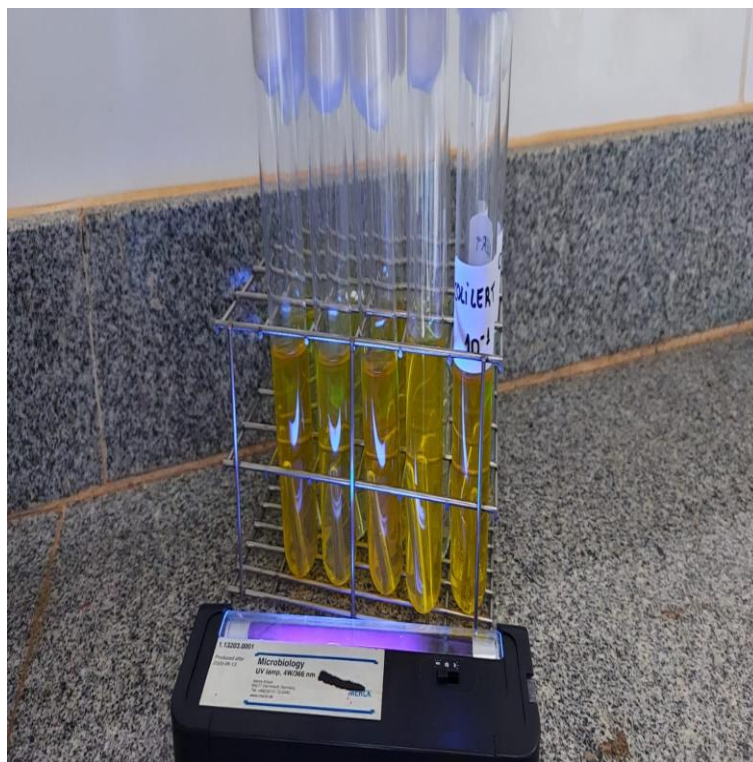


Foto 8: Teste com COLILERT - Tubos positivos para coliformes totais, na presença De Luz UV ($\lambda = 360$ nm).



Foto 9: Teste com COLISURE - Tubos positivos para coliformes totais, na presença De Luz UV ($\lambda = 360$ nm).

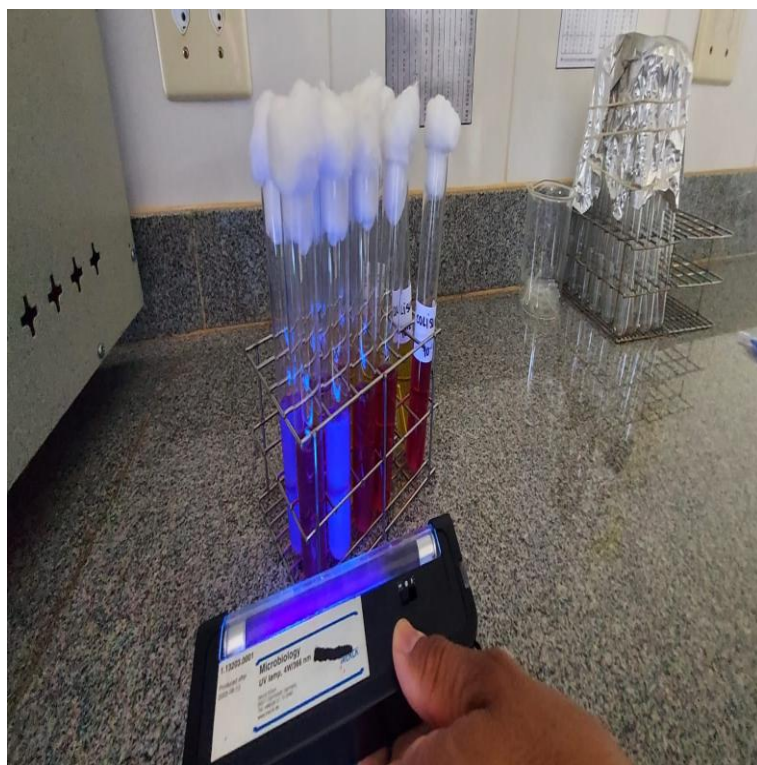


Foto 10: Teste com COLISURE - Tubos positivos para coliformes totais, na presença De Luz UV ($\lambda = 360$ nm).



Foto 11: Teste com QF-COLI - Tubos positivos para coliformes totais, na presença
De Luz UV ($\lambda = 360 \text{ nm}$).

A Foto 12 demonstra claramente a dificuldade de interpretação de resultados com o teste realizado com meio de cultura QF-COLI da Quimaflex.



Foto 12: Teste com QF-COLI - Tubos com dificuldade de interpretação de resultados

CONCLUSÃO

Primeiramente, é muito importante que se registre que a análise microbiológica realizada na água de abastecimento público, é a principal análise do controle de qualidade, pois, as principais doenças de veiculação hídrica são transmitidas por vírus e bactérias, sendo as bactérias das classes de coliformes e E. Coli as mais comuns, portanto é imprescindível a garantia de que a água que é consumida tenha total ausência de contaminação.

Quanto a metodologia para o presente ensaio comparativo entre os diferentes produtos, optou-se pela metodologia usualmente aplicada para os testes em nosso laboratório, por dois simples motivos:

- a) O DEAGUA não possui as “Cepas” padronizadas ou padrão de referência MRC, para testar os produtos, de acordo com a metodologia do “EPA” ou “Standard Methods”.
- b) Analiticamente, é tecnicamente aceitável o método comparativo para determinação da eficiência, e, portanto, como os testes foram realizados exatamente com mesmo procedimento analítico e uso da mesma amostra, vidrarias, equipamentos, etc, para os três produtos testados, atendendo o **método científico**.

Diante deste fato, e cuidado analítico, caso, os três produtos fossem similares e/ou compatíveis, os resultados obtidos seriam os mesmos ou muito próximos.

Porém, o que se observou com os resultados obtidos, e está claramente demonstrado nas fotos do presente Relatório Técnico, foram resultados bem diferentes, comprovando assim, que mesmo sendo fabricados e vendidos com a mesma finalidade, a performance dos produtos é bastante diferente.

Vamos a interpretação dos resultados:

Com relação ao teste quanti-qualitativo para Coliformes Totais, em amostra de água bruta, enquanto o QF-Coli identificou apenas 1.100 UFC (unidades formadoras de colônias) por 100 mililitros de amostra, o Colilert identificou 4.900 e o COLISURE 13.000 UFC por 100 mililitros.

Já com relação a quantificação de E.Coli, identificada através de fluorescência na presença de Luz UV, QF-Coli não deixou claro a presença ou não de contaminação, enquanto o Colilert não identificou nenhuma unidade formadora de colônia, o COLISURE identificou 400 UFC por 100 mililitros.

Com relação ao teste qualitativo (P/A) em amostra de água tratada, nenhum dos meios de cultura testados identificaram presença de coliformes totais e E.Coli na água de abastecimento público.

Veja bem, se o produto, quantifica minimamente, as bactérias existentes em um meio, que é certamente contaminado, como amostras de água bruta (água superficial sem tratamento), como podemos confiar que ele identificará adequadamente a contaminação em uma água tratada, clorada e de excelente qualidade?

Assim, deve, preferencialmente, utilizar um meio de cultura com maior capacidade de identificação de um meio contaminado.

Outro ponto muito importante a ser verificado nos testes, é a facilidade de identificação visual dos resultados, evitando assim interpretação errônea de falso negativo.

Neste quesito, é nitidamente claro, que o COLISURE é o meio de cultura que melhor atende, tanto na identificação da Coliformes Totais, quanto na identificação da fluorescência na presença da Luz UV.

Da mesma maneira, claramente, o QF-COLI é o meio de cultura que apresenta a pior performance, quanto a identificação do resultado, tanto com relação a mudança na coloração, quanto na identificação da fluorescência na presença da Luz UV, pois nem foi possível identificar se apresentava ou não fluorescência.

O COLILERT apresenta resultados com menor eficiência na capacidade de identificação de UFC, porém, a identificação de presença / ausência e fluorescência é muito boa, diferente do QF-COLI que não atende bem em nenhum dos quesitos.

Sendo assim, **é parecer técnico e recomendação** que seja adquirido preferencialmente o produto **SUBSTRATO CROMOGÊNICO DEFINIDO COLISURE DA MARCA IDEXX, PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, E DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E E.COLI EM ÁGUA.**

Guaíra/SP, 1º de março de 2024.

Juliana de Oliveira Nascimento
Auxiliar de Laboratório
CRQ IV 04261128

Adriana Martins Peres
Responsável Técnica
CRQ IV 04137888

Anexo I: Tabela de Número Mais Provável (NMP) de Coliformes e ou E. Coli

Table 2 - For 5 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs and 95 percent confidence intervals.											
Pos. Tubes			Conf. lim.			Pos. tubes			Conf. lim.		
0.1	0.01	0.001	MPN/g	Low	High	0.1	0.01	0.001	MPN/g	Low	High
0	0	0	<1.8	—	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	—