

Comparação das metodologias enzimática e da fermentação de lactose para estimativa de coliformes em rios

A quantificação de bactérias do grupo coliformes é utilizada mundialmente para a avaliação da qualidade das águas, mas, a metodologia utilizada para sua estimativa na maioria das vezes não tem sido considerada como um fator importante, apesar de estudos já sugerirem isso. Neste contexto, objetivo principal deste trabalho foi comparar as metodologias da fermentação de lactose em tubos múltiplos e do substrato enzimático (Colilert®), utilizadas para a estimativa de coliformes, a partir de amostras de águas superficiais com distintos graus de poluição. Para isso foram selecionadas duas bacias hidrográficas, a bacia do rio Belém em Curitiba/PR que é tipicamente urbana e a bacia do rio Nhundiaquara no trecho da serra do mar paranaense, no município de Morretes/PR. As análises bacteriológicas foram realizadas simultaneamente em laboratório a partir da mesma amostra de água. Os resultados apontaram que a técnica enzimática aparentemente é mais sensível que a da fermentação de lactose na estimativa de coliformes. Mostrando que a escolha da técnica para a determinação do NMP 100 mL-1 de coliformes pode variar a classe do rio perante a "condição de qualidade" (Resolução do CONAMA nº 357/05) das águas. O que pode tornar necessário a fixação de uma metodologia padrão para a avaliação do atendimento ao enquadramento dos corpos hídricos, no âmbito da qualidade bacteriológica.

Palavras-chave: Coliformes; Colilert®; Fermentação em Tubos Múltiplos; Qualidade das Águas.

Comparison of enzymatic methodologies and lactose fermentation for coliform estimation in rivers

The quantification of bacteria in the coliform group is used worldwide for the evaluation of water quality, but the methodology used for its estimation has not been considered an important factor, although studies already suggest this. In this context, the main objective of this work was to compare the methodologies of lactose fermentation in multiple tubes and the enzymatic substrate (Colilert®), used for the estimation of coliforms, from surface water samples with different degrees of pollution. Two basins were selected, the Belém river basin in Curitiba / PR, which is typically urban, and the Nhundiaquara river basin in the Serra do Mar state, in the municipality of Morretes / PR. The bacteriological analyzes were carried out simultaneously in the laboratory from the same water sample. The results indicated that the enzymatic technique is apparently more sensitive than that of lactose fermentation in the estimation of coliforms. The choice of the technique for the determination of the NMP 100 mL-1 of coliforms can vary the class of the river before the "quality condition" (Resolution of CONAMA nº 357/05) of the waters. This may make it necessary to establish a standard methodology for the assessment of compliance with the framework of water bodies, within the scope of bacteriological quality.

Keywords: Coliforms; Colilert®; Multiple Tube Fermentation; Water Quality.

Topic: **Microbiologia Agrícola e Ambiental**

Received: **03/07/2017**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Approved: **03/10/2017**

Demian da Silveira Barcellos

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7223117894053703>
demian.barcellos@gmail.com

Harry Alberto Bollmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6168934991476108>
<http://orcid.org/0000-0001-6407-6010>
harry.bollmann@puccpr.br



DOI: 10.6008/SPC2179-6858.2017.004.0002

Referencing this:

BARCELLOS, D. S.; BOLLMANN, H. A.. Comparação das metodologias enzimática e da fermentação de lactose para estimativa de coliformes em rios. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v.8, n.4, p.8-22, 2017. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2179-6858.2017.004.0002>

INTRODUÇÃO

Os coliformes são utilizados em larga escala no Brasil e em diversos países do mundo como indicador da qualidade das águas superficiais, sendo um dos principais parâmetros dos padrões mundiais de balneabilidade e potabilidade. No entanto a metodologia utilizada para sua detecção tem sido um fator na maioria das vezes esquecido por aqueles que avaliam os resultados e pelos próprios padrões de qualidade que utilizam este parâmetro. Diversas são as metodologias para a determinação do teor de coliformes em amostras de água, e estudos já tem demonstrado que uma mesma amostra de água analisada por duas metodologias diferentes pode detectar quantidades de bactérias consideravelmente diferentes (MANNAPPERUMA et al., 2011; MARQUEZI et al., 2010; GREGHI, 2005; ECKNER, 1998).

Quando os resultados de coliformes são expressos pelo Número Mais Provável (NMP), duas são as técnicas mais utilizadas na atualidade, que são o substrato enzimático (Colilert®) e a fermentação de lactose em tubos múltiplos. O substrato enzimático é uma técnica recente e pouco trabalhosa onde os resultados de coliformes são expressos após 24 horas de incubação. O substrato enzimático (Colilert®) tem por base a identificação de microrganismos pela análise de suas enzimas constituintes (COVERT et al., 1989). A fórmula do meio de cultura utilizado possui o substrato cromogênico orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), e o fluorogênico, 4-metilumbeliferil- β -D-glucorinídeo (MUG), que detectam simultaneamente os coliformes totais e *E. coli* presentes na água, por meio da alteração de cor no meio de cultura e fluorescência, respectivamente (MANAFI, 2000).

Já a técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos, que foi adotada já em 1914 como padrão da *US Public Health Service Drinking Water Standard* para todas as fontes de água, é bem trabalhosa e exige um período de incubação de 96h para a expressão dos resultados (WOLF, 1972). A técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos é baseada no princípio que as bactérias presentes na água podem ser separadas uma das outras por agitação resultando em uma suspensão de células bacterianas individuais, uniformemente distribuídas na amostra.

São inoculados volumes decrescentes de amostras em meios de cultura adequados ao crescimento dos microrganismos estudados. Através de diluições decimais e séries sucessivas de cinco tubos para cada volume de amostra inoculado, a combinação de resultados positivos e negativos permite a estimativa da densidade bacteriana presente na amostra (MACÊDO, 2003).

Alguns estudos já compararam os resultados de coliformes estimados pelas técnicas do substrato enzimático (Colilert®) e da fermentação de lactose em tubos múltiplos, no entanto ainda não há um consenso científico. E apesar das evidências científicas e do reconhecimento de instituições de renome nacional e internacional, sobre a maior confiabilidade do substrato enzimático (Colilert®) em relação à fermentação de lactose em tubos múltiplos para a estimativa de coliformes, como é o caso da APHA (1995) e BRASIL (2006) os estudos que já compararam estas duas técnicas ainda tem chegado em conclusões muito dispersas (EDBERG et al., 1990; MARQUEZI et al, 2010; GREGHI, 2005; ECKNER, 1998; CATANUSIO NETO, 2001; KRAMER et al., 2002).

Segundo a APHA (1995), a precisão e os limites de detecção são superiores nos testes de substratos enzimáticos. Manafi (2000) ressalta que além do maior rigor na detecção os substratos enzimáticos tornaram a detecção de bactérias muito mais rápida. O Ministério da Saúde também reconhece que para a estimativa do NMP 100mL⁻¹ de coliformes a técnica do substrato enzimático tem uma maior precisão, fornecendo ainda uma estimativa mais rápida do teor de coliformes na amostra (Brasil, 2006). Embora segundo Bubert et al. (2003) o Colilert® não seja capaz de detectar *E. coli* O157:H7, o que é preocupante pois esta bactéria já resultou em uma série de surtos de gastroenterite. E ainda segundo a CETESB (2008) 5% das linhagens de *E. coli* não possuem a enzima β-D-glicuronidase o que demonstra limitações desta técnica.

As técnicas baseadas na fermentação de lactose em tubos múltiplos apresentam menor sensibilidade e especificidade se comparadas às técnicas enzimáticas (CERQUEIRA et al., 1999; EDBERG et al., 1990). Além de serem mais trabalhosas exigem duas temperaturas de incubação (35,5 ± 0,2°C e 44,5 ± 0,2°C), totalizando, no mínimo, 72h para a confirmação dos resultados (ROMPRÉ et al., 2002).

Resultados dos quais ainda estão sujeitos a uma maior ocorrência tanto de falso-negativos como de falso-positivos (EDBERG et al., 1990; CERQUEIRA et al., 1999). Estudos concluem que pequenas variações no gradiente de temperatura podem ser o suficiente para a invalidação deste teste (CERQUEIRA et al., 1999), apontando que populações expressivas de bactérias heterotróficas interferem decisivamente no teste (EDBERG et al., 1990; EVANS et al., 1981). E ainda que linhagens importantes de *E. coli*, como a *E. coli* O157:H7 são incapazes de fermentar lactose e produzir gás tanto a 35°C como a 44°C, expressando assim resultados falso-negativos (DUFOUR, 1977).

Estimativas afirmam que em torno de 12% dos coliformes não produzem gás nos testes de fermentação de lactose (EVANS et al., 1981) e ainda que cerca de 10% de coliformes não fermentam lactose (FRICKER, 1994 citado por MANNAPPERUMA et al., 2011). Segundo Rompré et al. (2002) a precisão deste teste é baixa e depende necessariamente da quantidade de tubos utilizados. A técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos carece de precisão qualitativa e quantitativa mais permanece sendo muito utilizada pelo seu baixo custo e facilidade de execução do teste (ROMPRÉ et al., 2002).

Este estudo teve como objetivo comparar os resultados de coliformes expressos pelas metodologias do substrato enzimático (Colilert® em cartela Quanti-Tray®/2000) e da fermentação de lactose em tubos múltiplos, em amostras de águas superficiais com distintos graus de poluição. Os resultados deste estudo permitiram analisar as variações na “condição de qualidade” das águas (Resolução do CONAMA nº357) que a estimativa do NMP 100mL⁻¹ de coliformes pelas técnicas do substrato enzimático e da fermentação de lactose em tubos múltiplos podem gerar. Os resultados também possibilitaram uma análise da precisão destas duas técnicas para a estimativa de coliformes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas um total de 49 amostras, analisando o teor de coliformes em oito pontos amostrais (três na Bacia do Rio Nhundiaquara e cinco na Bacia do Rio Belém, presentes nas Figuras 1 e 2

respectivamente). Das 49 amostras coletadas sete são do ponto RB4 e seis dos demais pontos amostrais. A amostragem foi realizada durante cinco meses (agosto a dezembro) do ano de 2012.

A Bacia Hidrográfica do Rio Belém faz parte da bacia hidrográfica do Alto Iguaçu, no Paraná, e encontra-se inteiramente dentro do município de Curitiba, caracterizada como uma bacia urbana. A Bacia do Belém possui uma área de drenagem de 84km², abrigando 27% da população da cidade de Curitiba, o que contribui consistentemente para os altos níveis de degradação ambiental e para a baixíssima qualidade das águas tanto em seus tributários como no leito principal do rio (BOLLMANN et al., 2008).

A Bacia Hidrográfica do Rio Nhundiaquara faz parte da bacia hidrográfica do Atlântico, e está localizada no estado do Paraná, pertencendo aos municípios de Morretes, Antonina, Piraquara e Quatro Barras. A Bacia do Nhundiaquara constitui uma área de drenagem de 311km² tendo suas nascentes na serra do mar paranaense, o que faz com que esteja localizada predominantemente dentro de Unidades de Conservação (UCs). Os limites físicos da Bacia do Nhundiaquara é o escudo da serra do mar, a norte, sul e oeste já que seu fluxo vai em direção ao oceano, isto é a leste, desaguando na Baía de Antonina.

Os resultados das duas campanhas de monitoramento, que deram a base para a escolha destas duas bacias hidrográficas e nortearam a seleção dos pontos amostrais, estão presentes nos programas de monitoramento das pesquisas: “Mapeamento da qualidade bacteriológica das águas superficiais nas trilhas de acesso ao Pico Marumbi, Parque Estadual do Marumbi, Morretes, Paraná” (BARCELLOS et al., 2013) e “Os instrumentos jurídicos e programas de gestão dos recursos hídricos e seus reflexos na qualidade das águas na Bacia Hidrográfica do Rio Belém” (BRACHT, 2008). A escolha das duas bacias hidrográficas e dos pontos amostrais ocorreu a partir da observação dos graus de poluição microbiológica da água, obtidos através dos dados históricos de monitoramento da qualidade das águas nas duas bacias hidrográficas, e de experimentação laboratorial quando não haviam dados históricos.

A escolha de cinco pontos amostrais na Bacia do Belém e três na Bacia do Nhundiaquara ocorreu, pois, as condições bacteriológicas de águas que sofrem poucos impactos das atividades antrópicas, como é o caso dos pontos amostrais localizados na Bacia do Nhundiaquara, é mais homogênea; foi necessário um número menor de pontos amostrais para representar os diferentes níveis quantitativos de coliformes possíveis de serem encontrados nestas regiões. Já na Bacia do Belém devido à ampla variação quantitativa de coliformes na água, resultado dos impactos antrópicos, foi necessário um número maior de pontos amostrais.



Figura 1: Pontos monitorados na bacia do rio Nhundiaquara.

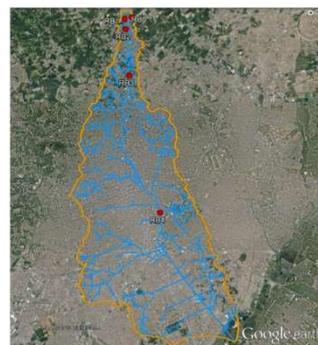


Figura 2: Pontos monitorados na bacia do rio Belém.

As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Análises Ambientais do curso de Engenharia Ambiental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), onde foram ensaiadas. As variáveis monitoradas neste estudo foram *Escherichia coli* e coliformes totais (estimados pela técnica do substrato enzimático - Colilert® em cartela Quanti-Tray®/2000), e coliformes termotolerantes e totais (estimados pela técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos).

As análises bacteriológicas realizadas pelas metodologias da fermentação de lactose em tubos múltiplos e do substrato cromogênico enzimático foram executadas simultaneamente em laboratório a partir da mesma amostra de água. Durante todo o período de coleta dos dados experimentais foram seguidas estritamente as recomendações de coleta, preservação, transporte, bem como os procedimentos analíticos para a determinação das variáveis monitoradas, constantes no *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

No ensaio da fermentação de lactose em tubos múltiplos foram realizadas as etapas presuntiva e confirmativa, com os meios de cultura: caldo lactosado (marca HIMEDIA), caldo bile verde brilhante (marca HIMEDIA) e o EC medium (marca Acumedia). Objetivando minimizar resultados falso positivos e negativos, na etapa presuntiva do ensaio, também foi utilizado o indicador de mudança de pH, púrpura de bromocresol, conforme recomenda a CETESB (1993). Este indicador de alteração do pH é importante para auxiliar na interpretação dos resultados e melhorar a precisão do método, já que a fermentação de lactose necessariamente acidifica o meio. E interferentes do ensaio podem resultar na formação de gás sem a fermentação de lactose ocorrer (falsos positivos), assim como a não formação de gás com a ocorrência da fermentação de lactose (falsos negativos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos foi elaborada a Tabela 1 que apresenta as porcentagens, de coliformes totais que são *E. coli* (substrato enzimático), de coliformes totais que são coliformes termotolerantes (tubos múltiplos) e de coliformes termotolerantes que são *E. coli* (substrato enzimático X tubos múltiplos). Para a construção da tabela 1 foram calculadas as porcentagens a partir de todas as amostras analisadas e foi efetuada a integração das porcentagens por ponto amostral a partir da média geométrica.

Tabela 1. Perfil médio de bactérias do grupo coliformes por ponto amostral.

| Pontos amostrais | Percentual de coliformes totais que são <i>E. coli</i> (SE) | Percentual de coliformes totais que são termotolerantes (TM) | Percentual de coliformes termotolerantes que são <i>E. coli</i> (TM x SE) |
|-------------------------|---|--|---|
| RB0 | 2,20 | 11,78 | 25,05 |
| RB1 | 7,32 | 19,03 | 229,54 |
| RB2 | 16,08 | 6,59 | 409,06 |
| RB3 | 31,22 | 27,39 | 115,08 |
| RB4 | 6,69 | 29,01 | 215,98 |
| RM0 | 0,41 | 4,84 | 86,80 |
| RN1 | 1,37 | 10,77 | 48,55 |
| RN2 | 3,25 | 6,27 | 159,52 |
| Média geométrica | 4,21 | 11,83 | 118,66 |

Legenda: SE: substrato enzimático; TM: tubos múltiplos.

Pode-se observar na tabela 1 que os três pontos amostrais localizados em áreas com influência predominante do meio natural (RM0, RN1 e RN2), e também o ponto RB0 – que sofre menores impactos das atividades antropogênicas em relação aos demais pontos com influência predominante do meio antropogênico, pois está num parque municipal (Parque das Nascentes do Rio Belém) – apresentam quantidades ínfimas de coliformes totais que são *E. coli*.

Embora os demais pontos amostrais localizados em áreas com influência predominante do meio antropogênico levantam a porcentagem de coliformes totais, que são *E. coli* para 4,21%. Com base nos elevados níveis quantitativos de coliformes totais que são *E. coli* presentes nos pontos RB1, RB2, RB3 e RB4, que provavelmente estão contaminados por esgoto.

Os pontos RB2 e RB3 apresentaram uma porcentagem de coliformes totais que são *E. coli* bem maior que os demais pontos, o que indica que a contribuição de esgotos domésticos nestes pontos amostrais é grande e os fatores de diluição menores. Já no ponto RB4 apesar de sabermos que o valor quantitativo de *E. coli* é o mais elevado monitorado na Bacia do Belém os resultados mostram que provavelmente a drenagem fluvial e outros efluentes contribuem significativamente para a diminuição das porcentagens de coliformes totais que são *E. coli*.

Já em relação à porcentagem de coliformes totais que são coliformes termotolerantes também é possível observar grandes distinções entre as áreas com influência predominante do meio natural das áreas com influência predominante do meio antropogênico, pois apesar do grupo dos coliformes termotolerantes incluírem bactérias de vida livre o gênero de bactérias predominante neste grupo é a *Escherichia*, que é exclusivamente fecal. Nos pontos RB3 e RB4 fica evidente que as porcentagens de coliformes totais que são coliformes termotolerantes são bem elevadas, compondo quase um terço do total de bactérias do grupo coliformes presentes nestes pontos amostrais. Indicando que estes pontos amostrais provavelmente são influenciados pelo lançamento de esgotos domésticos.

No que se refere as porcentagens de coliformes termotolerantes que são *E. coli*, apenas três pontos amostrais tiveram em sua média geométrica porcentagens de *E. coli* menores que de coliformes termotolerantes. Isso mostra que na maioria dos casos os valores de *E. coli*, estimados pelo substrato enzimático, são maiores que os de coliformes termotolerantes, estimados pelos tubos múltiplos, o que não poderia ocorrer já que a *E. coli* é apenas um dos gêneros de bactérias do grupo dos termotolerantes.

A média geométrica das porcentagens, de coliformes termotolerantes que são *E. coli*, nos oito pontos amostrais, revela que cerca de 100% (118%) dos coliformes termotolerantes estimados pela técnica dos tubos múltiplos são oriundos de material fecal se for considerada como referência a técnica do substrato enzimático. A média geométrica de 118% ainda aponta que as quantidades de bactérias de origem exclusivamente fecal na água, quando estimadas pela técnica dos tubos múltiplos, serão predominantemente menores que as quantidades apontadas pelo substrato enzimático, já que a quantidade de *E. coli* estimada pelos tubos múltiplos será ainda menor que a dos coliformes termotolerantes.

Influência das metodologias para estimativa de coliformes na avaliação da qualidade das águas

Foram produzidos gráficos de relação entre as medianas (P50%) do NMP 100mL⁻¹ de coliformes encontrados em cada ponto amostral e uma escala normalizada de qualidade das águas (Função de Utilidade Multidimensional) variando de 0,0 a 1,0 (Figura 3). Para o desenvolvimento da escala normalizada de coliformes termotolerantes foi utilizada a “condição de qualidade” que a Resolução do CONAMA nº357/05 permite quanto ao teor destes para cada uma das quatro classes de corpos hídricos de água doce.

A construção da escala normalizada de *Escherichia coli* foi baseada também na “condição de qualidade” da resolução do CONAMA nº357/05 com uma restrição 20% menor, como recomenda a Resolução nº274/00 do CONAMA. Já que a Resolução 357/05 permite a substituição do parâmetro coliformes termotolerantes pela *E. coli*, mas deixa está a cargo do órgão ambiental competente, que no caso do Paraná é o Instituto Ambiental do Paraná (IAP) que não estabeleceu limites para esta substituição. E para o desenvolvimento da escala de normalização dos coliformes totais foi utilizada a “condição” que a Resolução do CONAMA 20/86, já revogada permitia quanto ao teor destes para cada uma das quatro classes de corpos hídricos.

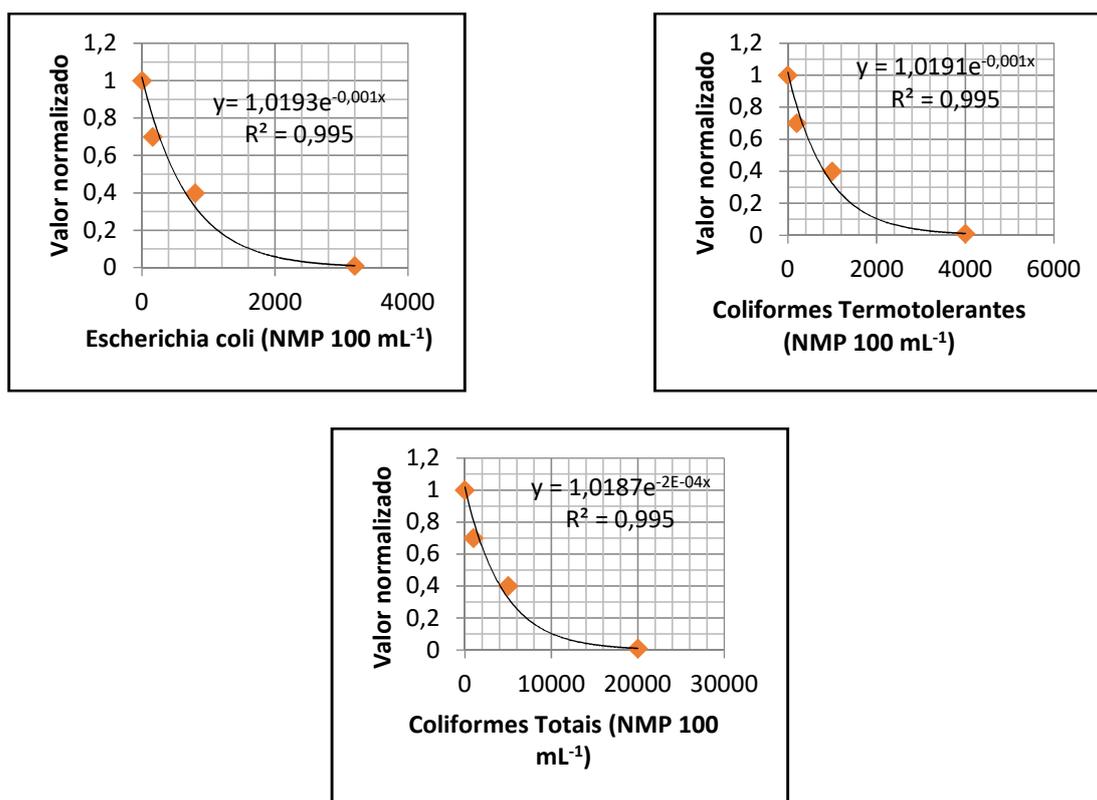


Figura 3: Gráficos de normalização.

Portanto para os valores da escala normalizada de 0,70 considerou-se os limites de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e coliformes totais (respectivamente: 200, 160 e 1000), para corpos hídricos de classe 1. Valores da escala normalizada de 0,40 considerou-se os limites de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e coliformes totais (respectivamente: 1000, 800 e 5000), para corpos hídricos de classe 2. Valores da escala normalizada de 0,0 considerou-se os limites de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e coliformes totais (respectivamente: 4000, 3200 e 20.000), para corpos hídricos de classe 3. Valores do NMP

100 mL⁻¹ de coliformes maiores que os limites para classe 3 sempre pontuaram 0,0 na escala normalizada pois o CONAMA não estabelece um limite de coliformes para corpos hídricos de classe 4.

As Funções de Utilidade Multidimensional desenvolvidas para os coliformes (Figura 3) demonstram que em termos de variabilidade média é insignificante a utilização do parâmetro coliformes termotolerantes ou do parâmetro *Escherichia coli* – com um limite 20% menos restritivo como orienta a Resolução 274/00 do CONAMA. Pois as equações geradas para os gráficos de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* passam a ser diferentes apenas na quarta casa após a vírgula, resultando em valores normalizados praticamente iguais. Na Figura 4 o NMP 100 mL⁻¹ de coliformes totais dos pontos RN1, RB0 e RB1 refletem em uma diferença na “condição de qualidade” resultante da distinção dos resultados estimados pelas duas metodologias.

No caso do ponto RN1, o valor normalizado de coliformes totais, estimados pela técnica TM, está a cima de 0,70 o colocando dentro do padrão de coliformes totais para rios de classe 1. Já o valor normalizado de coliformes totais estimado pelo SE está a baixo do 0,70 e a cima do 0,40 indicando que a “condição de qualidade” para o ponto RN1 é a de águas doces de classe 2. Enquanto que no caso do ponto RB0 o teor de coliformes totais estimado pela técnica TM indica que suas águas são de classe 2, no entanto a técnica SE estima valores de coliformes que excedem o limite para classe 2, rebaixando este ponto amostral para a “condição de qualidade” de classe 3.

No caso do ponto RB1 a técnica do SE estima valores de coliformes totais que o posicionam na classe 4 e pela técnica TM este ponto é elevado para a classe 3. No entanto no caso do ponto RM0 onde a quantidade de coliformes na água é baixa, por ele estar em condições prístinas, e nos casos dos pontos RB2, RB3 e RB4 onde a quantidade de coliformes na água é alta, devido ao lançamento de esgoto, a “condição de qualidade” indicada pelos dois métodos é a mesma.

Em relação ao ponto RN2 os valores de coliformes estimados pelos dois métodos apresentam uma diferença numérica grande, muito similar à do ponto RB1, mas essa distinção não chegou a alterar a “condição de qualidade” sendo que pelos dois métodos foi apontada a classe 3. Merece um destaque que a “condição de qualidade” que os coliformes totais indicaram é sempre pior quando a estimativa é feita pela técnica do SE, como é possível observar na Figura 4.

Na figura 5 é possível visualizar que os pontos RB0, RN2 e RB1 apresentaram uma “condição de qualidade” distinta, sendo também um reflexo de diferenças significativas entre as quantidades de bactérias estimadas pelos dois métodos. No caso do ponto RN2 quando foi feita a estimativa de coliformes termotolerantes, pela técnica TM, a “condição de qualidade” indicada é a de classe 1. Já quando a “condição de qualidade” do ponto RN2 é avaliada por meio da *E. coli*, estimada pelo SE, sua “condição de qualidade” é de classe 2.

No caso do ponto RB0 a situação se inverte, quando a “condição de qualidade” é avaliada por meio da *E. coli*, estimada pelo SE, sua “condição de qualidade” é de classe 1 e quando é avaliada pelos coliformes termotolerantes, realizando a estimativa pela técnica TM, sua “condição de qualidade” é de classe 2. Quanto ao ponto RB1 a “condição de qualidade” é de classe 3 quando é avaliada pelos coliformes termotolerantes e

de classe 4 quando é avaliada pela *E. coli*. Nos pontos RN1 e RM0 que apresentam teores baixos de coliformes termotolerantes na água, devido as suas condições prístinas, e nos pontos RB2, RB3 e RB4 que apresentam teores altos de coliformes termotolerantes, na água devido ao lançamento de esgoto, a “condição de qualidade” indicada pelos coliformes termotolerantes ou pela *E. coli* é a mesma.

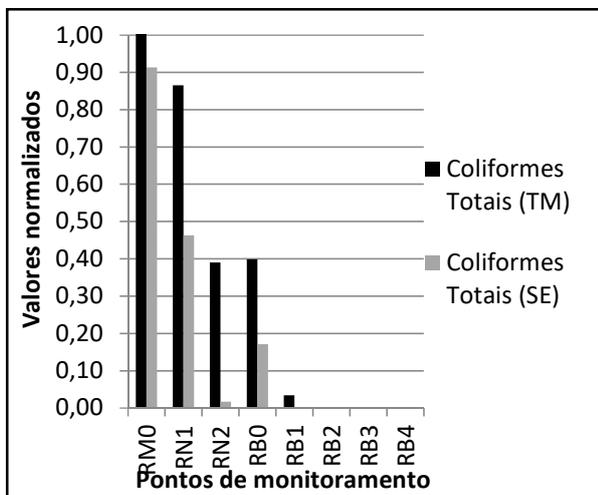


Figura 4: Variações na “condição de qualidade” a partir NMP 100 mL⁻¹ coliformes totais estimados pelos tubos múltiplos (TM) e substrato enzimático (SE).

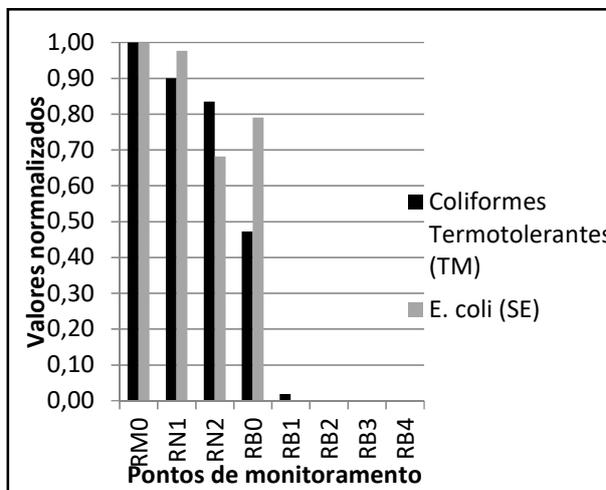


Figura 5: Variações na “condição de qualidade” a partir NMP 100 mL⁻¹ coliformes termotolerantes (tubos múltiplos - TM) e *Escherichia coli* (substrato enzimático - SE).

Com a aplicação do Teste F ($\alpha=0,05$) para variâncias e do Teste t ($\alpha=0,05$) para médias nos resultados de coliformes totais estimados pelos dois métodos, para cada ponto amostral (Tabela 2), verificou-se se existe semelhança estatística entre os valores de coliformes totais estimados pelos dois métodos. Na tabela 2, pode-se verificar que os valores de coliformes totais estimados pelos dois métodos são diferentes, pois apresentam 75% de diferença entre as variâncias e 37, 5% entre as médias, totalizando 87,5% de diferença estatística, já que apenas o ponto RB3 apresentou semelhança entre o NMP 100 mL⁻¹ de coliformes totais, determinados pelas duas técnicas. Por meio deste teste de hipótese é possível perceber que, com exceção do ponto RB3, os valores de coliformes totais estimados pelas duas técnicas são significativamente diferentes.

Tabela 2: Teste de semelhança estatística entre os valores de coliformes totais expressos pelos dois métodos.

| Pontos amostrais | Teste F | Teste t | Resultado |
|------------------|---------|---------|-----------|
| RB0 | ≠ | ≈ | ≠ |
| RB1 | ≠ | ≈ | ≠ |
| RB2 | ≠ | ≠ | ≠ |
| RB3 | ≈ | ≈ | ≈ |
| RB4 | ≠ | ≈ | ≠ |
| RM0 | ≠ | ≠ | ≠ |
| RN1 | ≠ | ≈ | ≠ |
| RN2 | ≈ | ≠ | ≠ |

Legenda: ≠ diferentes; ≈ semelhantes.

Além da diferença significativa entre os valores de coliformes totais estimados pelos dois métodos, mostrada pela tabela 2, as análises das Figuras 4 e 5 evidenciam uma possível influência prática das metodologias de estimativa de coliformes no monitoramento da qualidade das águas, já que estas estão interferindo na classificação das águas do CONAMA. Mostrando que é possível outros padrões de qualidade

que utilizem o NMP 100 mL^{-1} de coliformes, como os padrões de balneabilidade, Resolução 274/00 do CONAMA, e de potabilidade, Portaria 2.914 do Ministério da Saúde, também estarem sendo influenciados pelas metodologias. No que tange a Resolução 357/05 do CONAMA aparentemente fica explícito que talvez seja necessário a fixação de uma metodologia padrão para analisar a “condição de qualidade” já que a variabilidade do NMP entre as técnicas do substrato enzimático e dos tubos múltiplos mostrou-se influente.

Análise da estimativa de coliformes pelas técnicas da fermentação de lactose em tubos múltiplos e do substrato enzimático (Colilert®)

Na Figura 6 é expressa a relação entre os NMP 100 mL^{-1} de coliformes totais estimados pelas técnicas TM e SE. A função que tange esta relação é uma potência. O alto coeficiente de determinação (r^2) encontrado e a proporcionalidade na distribuição dos resultados ao longo do gráfico demonstram que a estimativa dos coliformes totais pelo SE pode ser feita com uma boa precisão a partir dos valores de coliformes totais obtidos pela técnica TM.

A linha tracejada visualizada no gráfico passa exatamente a 45° graus do eixo Y e X (reta de correspondência), e através dela é possível visualizar por onde a linha de tendência deste diagrama de dispersão deveria passar caso os resultados de coliformes totais estimados pelos dois métodos fossem iguais. A relação entre os valores de coliformes totais estimados pelas duas técnicas revela que as técnicas estimam valores diferentes, e o SE estima valores de coliformes totais maiores que a técnica TM.

Observa-se por meio da linha de tendência que os valores de coliformes totais, estimados pela técnica do SE, apresentam-se acima e a uma distância considerável da linha tracejada quando as amostras apresentam quantidades baixas de coliformes totais, indicando a estimativa de valores maiores por esta técnica quando as amostras apresentam quantidades baixas de bactérias. E na medida em que a quantidade de coliformes totais estimados pelas duas técnicas aumentam ocorre uma aproximação da linha de tendência e da linha tracejada, indicando que quanto maiores forem às quantidades de coliformes totais na água mais próxima é a estimativa dada pelos dois métodos.

Analisando a equação da reta da figura 6 pode-se observar que a estimativa de coliformes totais pelo SE será aproximadamente nove vezes maior que a do TM, quando a quantidade de coliformes presentes na água for de 1 NMP. Esta diferença de estimativa de coliformes totais dos dois métodos diminui gradualmente, chegando a ser insignificante para um NMP 100 mL^{-1} de aproximadamente 1.000.000.000 de coliformes totais.

A partir desta observação gráfica pode-se levantar duas hipóteses: 1) que a técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos é menos sensível do que a do substrato enzimático (Colilert®) para a estimativa de coliformes ou; 2) que a técnica do substrato enzimático (Colilert®) estima resultados de coliformes falso positivos. Considerando que a técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos utiliza um volume de amostra sempre dez vezes menor que a técnica do substrato enzimático (Colilert®), a confiabilidade da fermentação de lactose pode ser considerada menor.

O número de combinações estatísticas dos resultados também são menores quando a estimativa de coliformes é feita pela fermentação de lactose, o que propicia uma condição mais limitada de representação

da realidade. O princípio da técnica do substrato enzimático (Colilert®) notadamente é mais confiável que o da fermentação de lactose em tubos múltiplos, por trabalhar com enzimas constitutivas do grupo coliformes.

Enquanto a técnica da fermentação de lactose tem uma propensão maior para gerar resultados falso positivos, já que inúmeras bactérias tem a capacidade de fermentar lactose produzindo gás. O que pode fazer com que pequenas variações no gradiente de temperatura sejam o suficiente para a invalidação dos resultados (CERQUEIRA et al., 1999).

Pesquisas também tem demonstrado que o substrato enzimático tem uma maior capacidade de recuperação e crescimento de bactérias do grupo coliformes (MARQUEZI et al., 2010; GREGHI, 2005). Também se sabe que ocorre perda de dióxido de carbono durante a respiração bacteriana, na técnica de fermentação de lactose em tubos múltiplos. Pois a superfície do tubo de durhan é muito pequena em relação à do tubo de ensaio, não permitindo o armazenamento do dióxido de carbono que é produzido longe do tubo de durhan, podendo assim gerar resultados falso negativos. Outro fator relevante que pode influenciar os valores de coliformes estimados pela técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos é o repique.

O fato, observado na figura 6, de os valores estimados pelas duas técnicas serem mais próximos em amostras com quantidades grandes de bactérias e mais distintos em amostras com quantidades pequenas de bactérias, pode ser uma influência do repique. No repique a transferência de um inóculo de amostra com bactérias do grupo coliformes pode ser insuficiente quando a quantidade de bactérias na amostra é pequena. Portanto a hipótese de que a sensibilidade da técnica da fermentação de lactose em tubos múltiplos é menor do que a do substrato enzimático (Colilert®) parece mais provável.

Na figura 6 também pode-se visualizar que a técnica enzimática aparentemente perde a precisão de forma mais intensa que os tubos múltiplos, na medida em que a quantidade de coliformes na água é maior, pois os valores estimados pelos dois métodos passam a ser mais próximos na medida em que a quantidade de coliformes na amostra aumenta. Quanto maiores forem as diluições menor será o volume inoculado de amostra e menor será a precisão da estimativa para ambos os métodos. Mas, em termos de variabilidade média, apesar da perda de precisão maior da técnica enzimática em nem um momento a estimativa de coliformes pela fermentação de lactose foi maior. Portanto a sensibilidade do método enzimático permanece parecendo superior.

Na figura 7 pode-se observar a relação entre o NMP 100mL⁻¹ de *E. coli*, estimados pelo SE, e de coliformes termotolerantes, estimados pelo TM, que é regida pela função de potência. Através da linha de tendência e da reta de correspondência observa-se de uma forma geral que os valores de *E. coli* são aproximadamente iguais aos valores de coliformes termotolerantes.

O coeficiente de determinação (r^2) desta relação indica que 88% das variações de *E. coli* (SE) podem ser explicadas pelas variações de coliformes termotolerantes (TM), mostrando uma correlação forte entre os NMP 100mL⁻¹ destes dois parâmetros. Através da figura 7 é possível observar que para quantidades baixas de bactérias do grupo coliformes são praticamente iguais às estimativas de *E. coli* e coliformes termotolerantes.

Já para quantidades maiores de bactérias do grupo coliformes o NMP 100mL⁻¹ estimado de *E. coli* passa a ser maior que os valores estimados de coliformes termotolerantes. A variabilidade média dos valores de *E. coli* e coliformes termotolerantes iniciam passando pela reta de correspondência, indicando igualdade de valores estimados, e na medida em que a quantidade de coliformes na água aumenta a estimativa de *E. coli* passa a ser maior que a de coliformes termotolerantes, indicando uma provável perda de precisão maior da técnica de fermentação de lactose quando as diluições são maiores.

O caso da Figura 7 se opõe ao caso da Figura 6, pois diferentemente do gráfico anterior este indica que quem provavelmente perde precisão com mais intensidade, quando aumenta o número de diluições da amostra, é a técnica da fermentação de lactose. Talvez isso não tenha ocorrido na figura 6 por bactérias não coliformes estarem interferindo na estimativa de coliformes totais pela fermentação de lactose, já que a temperatura de incubação de 35 ± 0,5°C é muito propícia para o desenvolvimento de várias bactérias, que não pertencem ao grupo coliformes, podendo gerar resultados falso positivos, como já foi constatado por outros estudos (EDBERG et al., 1990; EVANS et al., 1981).

Já no caso da Figura 7 a temperatura mais elevada de incubação, de 44 ± 0,2°C, inibe a fermentação de lactose de várias bactérias não coliformes fazendo com que em maiores diluições ocorra uma diminuição mais intensa das estimativas do teste, já que neste caso, o teste não estará mais estimando resultados falsos positivos, e como utiliza sempre um volume de amostra bem menor que o utilizado no teste enzimático, provavelmente terá uma perda de precisão maior. Analisando a equação da reta da Figura 7 pode-se constatar que o NMP 100 mL⁻¹ de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* são realmente muito semelhantes. Pois apesar dos valores de *E. coli* serem maiores que os de coliformes termotolerantes quando existem quantidades altas de coliformes na água, esta diferença é pouco significativa. Já que para o valor máximo de coliformes termotolerantes obtidos neste estudo, um NMP 100mL⁻¹ de 21.000.000, de acordo com a variabilidade média dos resultados, o NMP 100mL⁻¹ de *E. coli* seria aproximadamente 1,5 vez maior.

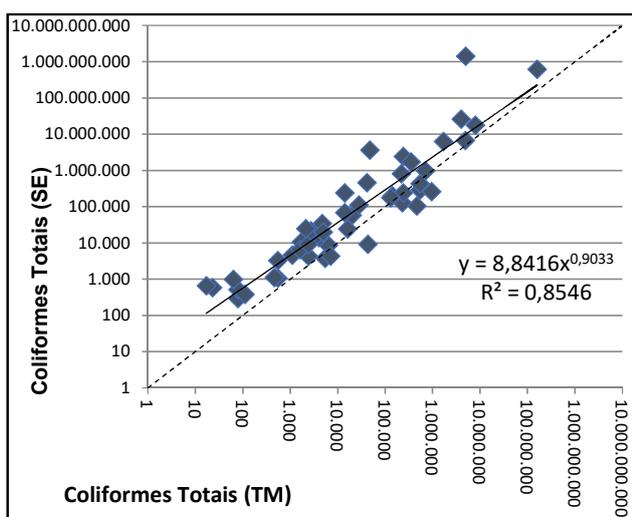


Figura 6: Relação entre o NMP 100mL⁻¹ de coliformes totais estimadas pelas técnicas dos tubos múltiplos (TM) e do substrato enzimático (SE).

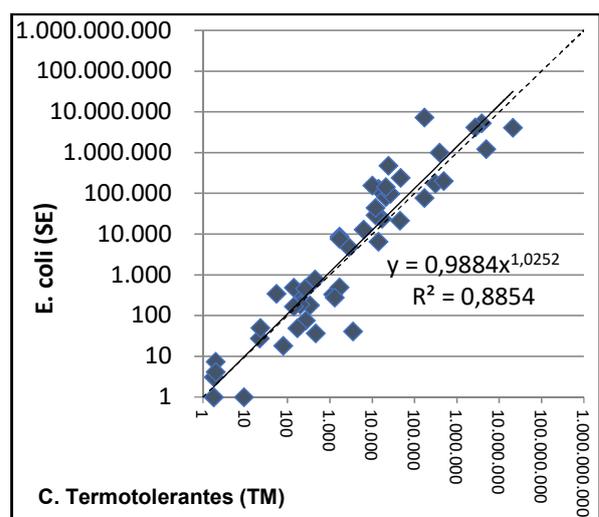


Figura 7: Relação entre o NMP 100 mL⁻¹ de coliformes termotolerantes (TM) estimadas pela técnica dos tubos múltiplos e de *E. coli* estimadas pelo substrato enzimático (SE).

As figuras 8 e 9 demonstram a relação entre coliformes totais e termotolerantes, estimados pela técnica TM, e coliformes totais e *E. coli*, estimados pela técnica SE. A função que tangente estes dois gráficos é uma potência e os dois coeficientes de determinação (r^2) obtidos demonstram uma forte correlação entre os dois parâmetros de cada um deles. No entanto a linha de tendência destes dois gráficos apresenta a similaridade de estar abaixo da linha tracejada, indicando que os valores estimados de coliformes termotolerantes e *E. coli* pelas duas técnicas serão sempre menores que os valores de coliformes totais estimados pelas duas técnicas.

A diferença entre as linhas de tendência destes dois gráficos é a inclinação e a distância que elas estão da linha tracejada, sendo que na Figura 9 a inclinação é maior e a linha de tendência inicia-se mais distante e acaba mais próxima da reta de correspondência. Isso indica que quando a presença de bactérias do grupo coliformes é baixa, os valores de *E. coli* e coliformes totais, estimados pelo SE, são mais diferentes que os valores de coliformes termotolerantes e coliformes totais, estimados pelo TM.

Já quando o NMP 100 mL⁻¹ de bactérias do grupo coliformes na água estão próximos do 1.000.000.000, esta situação se inverte. Observa-se nos dois gráficos que as linhas de tendência tendem a se juntar com a linha tracejada, demonstrando que quanto maiores forem as quantidades de bactérias do grupo coliformes presentes na água, mais hegemônica será a presença de *E. coli* e coliformes termotolerantes, o que atesta que a presença de bactérias de origem fecal passa a ser mais predominante.

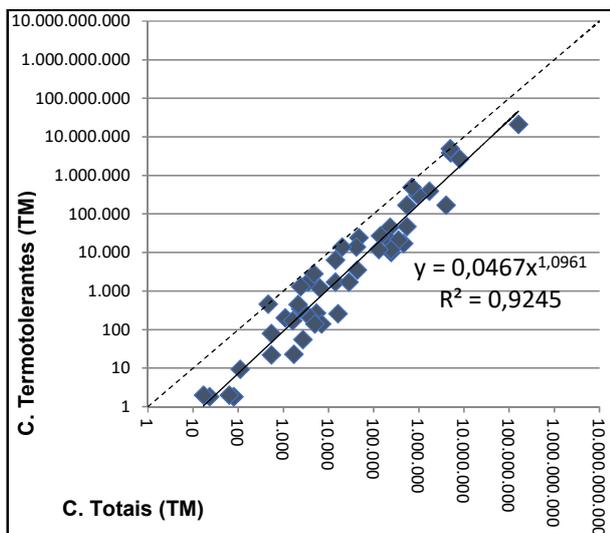


Figura 8: Relação entre o NMP 100 mL⁻¹ de coliformes termotolerantes e totais estimadas pela técnica dos tubos múltiplos (TM).

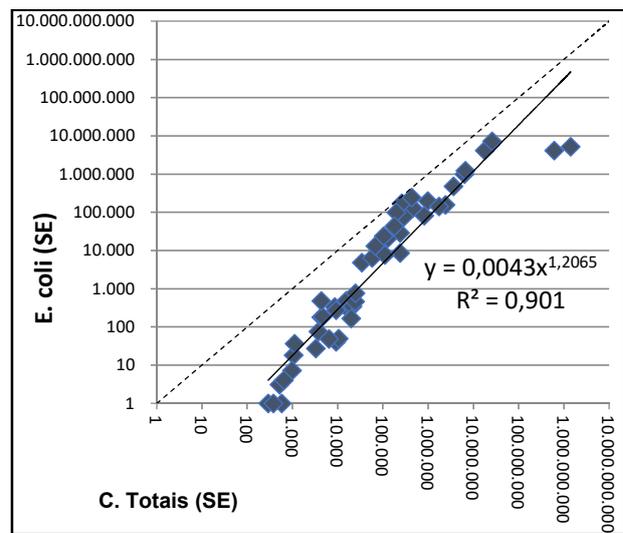


Figura 9: Relação entre o NMP 100 mL⁻¹ de *Escherichia coli* e coliformes totais estimadas pela técnica enzimática (SE).

CONCLUSÕES

A partir deste estudo foi constatado, por meio dos resultados de monitoramento, da literatura científica e da análise das metodologias laboratoriais que provavelmente a precisão da técnica do substrato enzimático (Colilert®) é superior à da fermentação de lactose em tubos múltiplos. A análise da estimativa de coliformes pela técnica enzimática (Colilert®) e da fermentação de lactose, a partir de mesmas amostras, apontaram que a técnica do substrato enzimático aparentemente é mais sensível que a dos tubos múltiplos, e estima resultados de coliformes totais, em termos de variabilidade média, sempre maiores, sendo que em

áreas naturais, onde o nível quantitativo de coliformes na água é menor, os resultados da estimativa de coliformes totais pelos dois métodos apresentaram-se mais diferentes que em áreas antropogênicas. Indicando a possibilidade de bactérias não coliformes estarem interferindo na estimativa de coliformes totais, pela técnica dos tubos múltiplos.

A comparação da estimativa de *E. coli*, pela técnica do substrato enzimático, e de coliformes termotolerantes, pela técnica dos tubos múltiplos, mostrou valores de *E. coli* maiores que de coliformes termotolerantes em uma mesma amostra, o que aponta a incompatibilidade das estimativas de coliformes entre os métodos. A variabilidade média dos resultados mostrou que em áreas naturais a estimativa de *E. coli* e coliformes termotolerantes é praticamente igual.

Já para áreas antropogênicas, com o recebimento intenso de esgotos brutos, a estimativa de *E. coli* pelo substrato enzimático passou a ser um pouco superior à dos coliformes termotolerantes estimados pelos tubos múltiplos, algo que se pode atribuir a perda de precisão maior da fermentação de lactose em virtude das diluições.

Os resultados de coliformes estimados pelas técnicas da fermentação de lactose em tubos múltiplos e do Colilert® (Quanti-Tray®/2000) mostraram-se significativamente diferentes, em termos das médias e das variâncias. Sendo até mesmo capaz de ocasionar variações na classificação do rio perante a “condição de qualidade”, das Resoluções do CONAMA nº 357/05 e nº 20/86, tanto em relação aos coliformes totais quanto aos termotolerantes.

O que demonstra que talvez seja necessário os padrões (enquadramento dos corpos hídricos, balneabilidade e potabilidade), que utilizam os coliformes como indicadores da qualidade das águas, fixarem também a metodologia de laboratório a ser utilizada para sua estimativa. A variação de qualidade ocasionada pela metodologia utilizada para a estimativa de coliformes pode também estar ocorrendo com os padrões de balneabilidade e potabilidade, portanto necessitando de investigações neste sentido.

REFERÊNCIAS

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Olympia: American Public Health Association, 2012.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. Olympia: APHA, 1995.

BARCELLOS, D. S.; BOLLMANN, H. A.. Mapeamento da qualidade bacteriológica nas trilhas de acesso ao Pico Marumbi, Parque Estadual do Marumbi, Morretes, Paraná. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 27. **Anais**. Goiânia. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2013.

BOLLMANN, H. A.; EDWIGES, T.. Avaliação da qualidade das águas do Rio Belém, Curitiba-PR, com o emprego de indicadores quantitativos e perceptivos. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.13, n.4, p.443-452, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522008000400013>

BRACHT, C. C.. **Instrumentos jurídicos e programas de gestão dos recursos hídricos e seus reflexos na qualidade das águas na bacia hidrográfica do rio Belém**. Dissertação (Mestrado em Gestão Urbana) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2008.

BRASIL. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

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: 2003.

CATANUSIO NETO, R.. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.91, p.64-67, 2001.

CERQUEIRA, D. A.; HORTA, M. C. S.. Coliformes fecais não existem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20. **Anais**. Rio de Janeiro:

Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999.

CETESB. Companhia Ambiental do estado de São Paulo. **Norma técnica vigente:** Coliformes Totais e Fecais – Determinação pela técnica dos tubos múltiplos: método e ensaio. São Paulo: CETESB. 1993.

CETESB. Companhia Ambiental do estado de São Paulo. **Relatório técnico:** Monitoramento de Escherichia Coli e Coliformes Termotolerantes em pontos de rede de avaliação da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2008.

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. **Applied and Environmental Microbiol**, v.55, n.10, p.2443-2447, 1989.

DUFOUR, A. P.. Escherichia coli: The Fecal Coliform. In: HOADLEY, A. W.; DUTKA, B. J.. **Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water**. Philadelphia: American Society of Testing and Materials, 1977. p.48-58.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3079-3083, 1998.

EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J.; SMITH, D. B.; KRIZ, N. J.. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.2, p.366-369, 1990.

EVANS, T. M.; WAARVICK, C. E.; RAMON, J. S.; LECHEVALLIER, M. W.. Failure of The Most- Probable Number Technique to Detect coliforms in Drinking Water and Raw Water Supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.1, p.130-138, 1981.

GREGHI, S. Q.. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para a detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação a técnica de fermentação em tubos múltiplos**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

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

MACÊDO, J. A. B.. **Métodos laboratoriais de análises físico-químicas e microbiológicas**. 2 ed. Belo Horizonte: CRQ, 2003.

MANAFI, M.. New developments on chromogenic and fluorogenic culture media. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.205-218, 2000. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00312-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3)

MANNAPPERUMA, W. M. G. C. K.; ABAYASEKARA, C. L.; HERATH, G. B. B.; WERWLLAGAMA, D. R. I. B.; HEINONEM-TANSKI, H.. Comparison of bacteriological methods for detecting and enumerating total coliforms and Escherichia coli in water. **Research Journal of Microbiology**, v.6, p.851-861, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3923/jm.2011.851.861>

MARQUEZI, M. C.; GALLO C. R.; DIAS, C. T. S.. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *coli* em amostras de água. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.291-296, 2010.

ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; ROUBIN, M. R.; LAURENT, P.. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v.49, n.1, p.31-54, 2002. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00351-7](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00351-7)

WOLF, H. W.. The coliform count as a measure of water quality. In: MITCHELL, R.. **Water Pollution Microbiology**. New York: Wiley-Interscience, p.333-345, 1972.