

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Avaliação da técnica 3MTM PetrifilmTM para análises microbiológicas de água de
consumo humano na região de Campinas**

Cristina de Abreu Constantino

Bióloga

Prof. Dr. José Luiz Pereira

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C766a Constantino, Cristina de Abreu
Avaliação da técnica 3MTM PetrifilmTM para análises
microbiológicas em água de consumo humano na região de Campinas /
Cristina de Abreu Constantino. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: José Luiz Pereira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Avaliação de métodos. 2. Água potável. 3. Métodos rápidos
(Microbiologia). 4. Bactérias. I. Pereira Luiz, José. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of 3MTM PetrifilmTM technique for human drink water analysis in
Campinas region

Palavras-chave em inglês (Keywords):Methods evaluation , Drinking water, Rapid methods
(Microbiology), Bacteria

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: José Luis Pereira

Karen Signori Pereira

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Data da defesa: 03/03/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

CRISTINA DE ABREU CONSTANTINO

**Avaliação da técnica 3MTM PetrifilmTM para análises microbiológicas de água de
consumo humano na região de Campinas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Pereira (Orientador)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye (Membro)

Profa. Dra. Karen Signori Pereira (Membro)

Dra. Neusely da Silva (Membro)

Dr. Tomomasa Yano (Membro)

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira por aceitar ser meu orientador e compreender minha falta de tempo.

À Norma Miya e colegas do laboratório de Toxinas Microbianas, Alessandra, Isabela e Rafael por todo o suporte e carinho durante o projeto.

Aos amigos do laboratório de Saneamento ambiental Enelton, Fernando e Ligia pela ajuda nas análises físico-química.

Aos atenciosos pesquisadores Doutora Neusely Silva, Prof. Dr. Edson Nour e Dr. Romeu Cantúcio pelo suporte no desenvolvimento deste projeto.

À amiga Heloisa Ruppert pela revisão estatística e Letícia Feix de Abreu pela revisão de português.

À Interlab S.A. pelo fornecimento de reagentes com significativos descontos.

À 3M pelo fomento deste projeto, através do Genesis Grant e liberação de 15% do meu tempo profissional para dedicação ao mestrado.

E finalmente, ao meu amado marido Bruno Constantino, pela ajuda com coletas e contagens noturnas, mas, principalmente, pelo suporte e pela paciência com minha ausência.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	04
1. INTRODUÇÃO.....	07
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
2.1 Panorama da água no Brasil e no mundo	09
2.2 Métodos para análise de Potabilidade	10
2.2.1 Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.2 Bactérias Heterotróficas	12
2.2.3 Métodos 3M™ Petrifilm para Contagem de Bactérias Aeróbias, Coliformes e <i>E. coli</i>	13
3. OBJETIVOS GERAIS	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1 Planejamento experimental	17
5.2 Localização e data das coletas de amostras	17
5.2.1 Água bruta e água de abastecimento	19
5.2.2 Água de Poços	21
5.2.3 Água de Fontes	22
5.3 Análises Físico-químicas	24
5.4 Contaminação das Amostras	24

5.5 Determinação do Tempo e Concentração de Cloro Adequada	25
5.6 Análises Microbiológicas de Bactérias Heterotróficas em Placa	26
5.7 Análises Microbiológicas de Coliformes Totais e <i>E. coli</i>	27
5.7.1 Análise Confirmatória de Coliformes	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1 Análises Físico-Químicas	29
6.2 Análises Microbiológicas	33
6.2.1 Contagem total de bactérias heterotróficas	33
6.2.2 Descritivo Estatístico para análise de bactérias heterotróficas	33
6.3 Resultados para Contagem de Coliformes e <i>E. coli</i>	39
6.3.1 Resultados para Contagem de Coliformes e <i>E. coli</i> para água de abastecimento.....	40
6.3.2 Resultados dos testes de confirmação bioquímica de <i>E. coli</i> e coliformes	41
6.3.3 Descritivo Estatístico para análise de Coliformes e <i>E. coli</i> para água de consumo humano	42
6.3.4 Análise dos dados para água de poços e fontes 3M TM PFEC x M - Endo Agar	48
7. CONCLUSÕES GERAIS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. ANEXOS	64
9.1 Resultados microbiológicos	64
9.2 Resultados dos testes de identificação bioquímica	77

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Local de coleta de água bruta, próximo ao ponto de captação da estação de abastecimento - Rio Atibaia	20
Figura 2: Local de coleta de água bruta próximo ao ponto de captação da estação de abastecimento - Rio Jaguari	21
Figura 3: Local de coleta de água de poço privado - Poço chácara do Dedé	22
Figura 4: Local de coleta de água de fonte privada - Água da Fonte	23
Figura 5: A - área onde se localiza fonte pública Taquaral; B - local de captação de água, sem proteção ou controle	23
Figura 6: Diagrama das etapas de análise de bactérias heterotróficas para água bruta. Para amostras de poços e fontes não foi realizada a contaminação, pois as amostras apresentavam a microbiota - alvo naturalmente	26
Figura 7: Diagrama das etapas de análise de coliformes e <i>E. coli</i> para água bruta. Para amostras de poços e fontes não foi realizada a contaminação, pois as amostras apresentavam a microbiota - alvo naturalmente	28
Figura 8 - Distribuição das espécies cloraminas em função da razão Cl_2 : N (Daniel, 2001)	32

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: planejamento das coletas	17
Tabela 2: identificação das amostras	19
Tabela 3: Resultados das análises físico-químicas	29
Tabela 4: Dados das contagens de bactérias heterotróficas, transformados em logaritmos	64
Tabela 5: Análise conjunta das 3 matrizes de água para contagem de total de bactérias heterotróficas - 3M TM PFAC x PCA	34
Tabela 6: Teste de Bonferroni - Intervalo de confiança 95% para desvio padrão	38
Tabela 07: dados das contagens de coliforme e <i>E. coli</i> para 3M TM PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos	70
Tabela 08: Identificação das colônias de <i>E. coli</i> e coliformes pelo método Crystal BD TM	77
Tabela 09: Estatística descritiva para água de consumo humano comparando os métodos 3M TM PFEC x M-Endo Agar	73
Tabela 10: Teste Bonferroni com 95% de intervalo de confiança para desvio padrão .	43
Tabela 11: dados para teste Mann-Whitney LOG 3M TM PFEC X M-ENDO ÁGAR para água de consumo humano	48
Tabela 12: Estatística descritiva para água de poços e fontes 3M TM PFEC x M-Endo Agar	49
Tabela 13: Teste Bonferroni, considerando 95% de intervalo de confiança para o desvio padrão	54
Tabela 14: dados para teste Mann-Whitney comparando as contagens em logaritmos dos métodos 3M TM PFEC x M-ENDO ÁGAR para água de poços e fontes	55

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Análise conjunta das contagens em logaritmos, comparando os métodos 3M TM PFAC x PCA para as diferentes matrizes	43
Gráfico 2: Análise da normalidade dados em logaritmos dos resultados das contagens de bactérias heterotróficas com o método 3M TM PFAC	44
Gráfico 3: Análise da normalidade - dados dos resultados com o método contagem total de bactérias em placa - PCA	45
Gráfico 4: Teste de variâncias iguais comparando os resultados das contagens em logaritmos para os métodos 3M TM PFAC x PCA	46
Gráfico 5: Análise conjunta dos dados em logaritmos, comparando os métodos 3M TM PFEC x M- Endo Ágar para amostras de água de consumo humano	63
Gráfico 6: Análise da normalidade dos dados para amostras de água de consumo humano, analisadas com o método 3M TM PFEC	64
Gráfico 7: Análise da normalidade dos dados para amostras de água de consumo humano analisadas com o método M-Endo Agar	65
Gráfico 8: Teste de variâncias iguais para água de consumo humano utilizando 3M TM PFEC x M-Endo Agar	66
Gráfico 9: Análise conjunta da variabilidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando os métodos 3M TM PFEC x M-Endo	68
Gráfico 10: Análise conjunta da normalidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando o método 3M TM PFEC	69
Gráfico 11: Análise de normalidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando o método M-Endo Agar	70

Gráfico 12: Teste de variâncias iguais para água de poços e fontes comparando as contagens em logaritmos 3M TM PFEC x M-Endo Ágar	71
---	----

RESUMO:

No Brasil, a Portaria MS nº. 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece, entre outros parâmetros, a análise de coliformes totais, termotolerantes ou *Escherichia coli* (*E. coli*) e de bactérias heterotróficas para análise de água para consumo humano, em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas e nascentes.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) avalia métodos para diferentes aplicações ambientais, entre outras, para análise de água potável, que se aprovados, são publicados como métodos oficiais no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Este manual recomenda muitos princípios de reações e métodos para análise de água potável e é muito importantes que se compreendam as limitações e benefícios destes métodos antes de utilizá-los, para garantir a segurança e qualidade microbiológica da água de consumo humano.

Os métodos convencionais de análise microbiológica de água para consumo humano requerem um mínimo de 24 horas de incubação, seguidos por procedimentos de confirmação dos resultados positivos, que duram entre 24-48 horas, o que gera uma demanda de métodos mais rápidos de análise.

O uso das Placas 3M™ Petrifilm™ não está aprovado pela EPA, e, consequentemente, não está publicada no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

Este estudo apresenta resultados comparativos do desempenho da tecnologia 3M™ Placas Petrifilm™ para contagem de Coliformes e *E. coli* (EC) e Contagem de Aeróbios (AC) contra as metodologias convencionais para as análises de bactérias do grupo coliformes (Endo) e para contagem padrão de bactérias heterotróficas (PCA),

através do método de membrana filtrante e técnica de plaqueamento em profundidade, respectivamente, seguindo os procedimentos descritos no protocolo 821-B-03-004, da EPA.

As amostras foram obtidas de dois rios que suprem o fornecimento de água potável (antes e após o tratamento na estação de abastecimento), dois poços e duas fontes na região da cidade de Campinas, estado de São Paulo, Brasil.

A água bruta dos rios foi utilizada para contaminar a água potável, e em seguida, foi realizado estresse por cloração, (0.1mg/L – 5 minutos); a água dos poços e fontes estava naturalmente contaminada. Parâmetros físico-químicos foram avaliados.

A mediana das contagens de coliformes e *E. coli* para água de consumo humano oriunda das estações de tratamento, com as 3MTM Placas Petrifilm EC foi igual a 1,9085 e para o meio Endo igual a 1,8603. O resultado do teste de Mann-Whitney foi $W = 2786,5$ o que demonstrou que não se pode rejeitar a igualdade dos métodos, já que W é maior do que 2525,0. O método Petrifilm EC apresentou menor variabilidade com $p\text{-valor} = 0,014$, com menor desvio padrão para o método EC (0,16), do que o método Endo (0,29) e maior precisão, com Coeficiente de variação (CV) = 8,43 para EC x CV = 15,91 para ENDO.

Para amostras de água de fontes e poços não tratados, 40 resultados de contagens de coliformes foram avaliados e o método 3MTM Petrifilm EC apresentou recuperação estatisticamente inferior do que o método de referência, porém com maior precisão com CV=12, 26 para o método EC x CV = 16,44 para o método ENDO.

Para contagens de bactérias heterotróficas, as amostras das três matrizes água foram analisadas conjuntamente. Não houve diferença na recuperação com o método 3MTM Petrifilm AC, pois $W = 8455,5$ é maior do que 8145, 0, com medianas de 2,0294

e 2,0212 para o método PCA, com p-valor de 0,253. O desvio padrão de 0,40 para o 3MTM Petrifilm AC e 0,49 para o método PCA demonstram que os métodos apresentaram recuperação muito similar das colônias e superioridade na precisão do método 3MTM Petrifilm AC, com CV = 19,78 x CV = 25,76 para o método PCA.

Observou-se que não houve diferença estatística significativa e que há uma forte correlação entre os métodos convencionais e as placas 3MTM Petrifilm.

A técnica 3MTM Petrifilm é rápida, padronizada, confirmatória e precisa e com base nestes resultados sugere-se que pode ser utilizada como um método prático para análise de bactérias heterotróficas, coliformes e *E. coli* em água de consumo humano, alternativamente à metodologia convencional, atendendo à demanda das empresas de alimentos, bebidas e abastecimento de água.

ABSTRACT:

In Brazil the normative MS nº. 518/2004 of Health Agency establishes, among others parameters, the analysis of total, thermotolerant coliforms or *Escherichia coli* (*E. coli*) and of heterotrophic bacteria for drinking water, including springs, wells and other sources of human drink water.

Many principles of reactions are recommended for water potability analysis in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater that proclaim the validated method for water analysis, and are very important to understand the limitations and benefits of these methods before the use of these, to guarantee the security and microbiological quality of the human drinking water.

The US Environmental Protection Agency (EPA) evaluates methods for many environmental uses, between others, to drinking water analysis, that been approved will be published as official methods in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. This Standard recommend that many reaction principle's and methods for drinking water analysis and is very important that be understood the limits and benefits of those methods before using it, for warranty the safety and microbiological quality of human drinking water.

The conventional methods of microbiological water analysis of human consumption requires a minimum of 24 hour of incubation, followed for confirmatory procedures of the positive results, that last between 24-48 hours, what it generates a demand of faster methods of analysis.

The use of 3M™ Petrifilm™ Plates is not approved by the EPA and consequently is not published in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

This study shows comparative results from the performance of the technology 3M™ Petrifilm™ Plates for counting of coliforms and *E. coli* (EC) and counting of aerobic organisms (AC) versus the conventional methodologies for the analyses of coliforms bacteria (Endo) and for standard counting of heterotrophic bacteria (PCA), through the method of membrane filtration and pour plate technique, respectively, following the protocol EPA 821-B-03-004 procedures.

Samples were obtained from two rivers that are suppliers of drinking water (prior and after the supplier station treatment), two wells and two fountains in the Campinas city region, São Paulo state/ Brazil. The raw river water was used to spike drinking water, after chlorination stress [0.1mg/L – 5 minutes]; wells and fountains were naturally contaminated. Physical-chemical parameters were evaluated.

Median was EC = 1,9085 and Endo = 1,8603. The result from Mann-Whitney test was $W = 2786,5$, that shows the equality between methods can not be reject since W is $> 2525,0$. Petrifilm method shows lower variability with $p\text{-value} = 0,014$, with lower Standard Deviation to EC (0,16) than Endo (0,29) and higher precision, with $CV = 8,43$ for EC vs. $CV = 15,91$ for ENDO.

For the untreated water from wells and fountains, 40 coliforms results were evaluated and EC results were statistically different and lower than the reference method, but higher precision with Coefficient of Variation (CV) = 12, 26 for EC method vs. $CV = 16,44$ to ENDO method.

For heterotrophic counts, the samples for 3 matrices were analyzed together. There is no recovery difference for 3M™ Petrifilm AC method since $W = 8455,5$ greater than 8145,0 with medians of 2,0294 and 2,0212 for PCA method, with a $p\text{-Value}$ of 0,253. The Standard Deviation of 0,40 for 3M™ Petrifilm AC and 0,49 for

PCA method shows that both methods presents a very similar recover of colonies and the superiority of precision of the 3MTM Petrifilm AC method, with CV = 19,78 vs. CV = 25,76 for PCA method.

Was observed that there is no statistic significant difference and there is a strong correlation between the traditional and 3MTM Petrifilm Plates.

The 3MTM Petrifilm technique is rapid, standardized, confirmatory and precise and based in these results should be suggested that it can be used as a practical method for heterotrophic bacteria, coliforms and *E. coli* analysis in human drinking water, alternatively to the conventional methodology, attending the demand of the companies of food, beverages and water supply stations.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:

Segundo o Ministério da Saúde, a doença diarreica aguda é a quarta principal responsável pela mortalidade infantil no Brasil. A ausência de água potável e de sistemas de saneamento adequados são as principais causas de doenças intestinais (SAÚDE BRASIL, 2008).

Para garantir a qualidade microbiológica da água no Brasil, a Portaria MS nº. 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece que água potável seja a água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde (SAÚDE BRASIL, 2004).

Para avaliação dos parâmetros microbiológicos são necessárias as análises de coliformes totais, termotolerantes ou, preferencialmente, *Escherichia coli* (*E. coli*) e de micro-organismos heterotróficos. São aceitos pela Portaria MS nº. 518/2004 como métodos oficiais de análise aqueles que atendam às especificações das normas nacionais que disciplinem a matéria, da edição mais recente da publicação *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), ou normas publicadas pela *International Standardization Organization* - ISO (SAÚDE BRASIL, 2004).

Vários métodos para detecção coliformes são aprovados e recomendados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), como por exemplo: a técnica de fermentação em tubos-múltiplos ou técnica do número mais provável (NMP), a técnica de membrana filtrante e ensaios de presença ou ausência, incluindo testes baseados na detecção de o-nitrophenyl- β -D-galactopiranosídeo e 4-metilumbeliferil - β -D-glucuronideo - ONPG-MUG (WILDEBOER et al. 2010).

O método 3MTM Petrifilm para contagem de coliformes e *E. coli*, bem como, para contagem de micro-organismos aeróbios são métodos validados para análise de alimentos, utilizados mundialmente e possuem diversas aprovações de instituições internacionais, como da *Association of Analytical Communities* (AOAC) e da *Association Française de Normalisation* (AFNOR); sendo um método pronto para uso, rápido e simples de utilizar. Todavia, não foram avaliados por estas instituições para análise de água potável e não se encontram descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

As recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América – *Environmental Protection Agency* (EPA) são descritas na norma *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Estas metodologias são mundialmente aceitas e devem ser avaliadas e aprovadas pelos órgãos regulatórios locais de cada país.

Diretrizes internacionais e nacionais adotadas, em geral, consideram como um dos principais indicadores da qualidade microbiológica da água a ausência de *Escherichia coli* (*E. coli*) em 100 mL de amostra (HEIJNEN e MEDENA, 2009). Assim, um estudo seguindo as determinações da Portaria MS nº. 518/2004 e o protocolo para comparação de métodos 821-B-03-004 (EPA, 2004) para comparar o método 3MTM Petrifilm para análise de coliformes e *E. coli* e aeróbios pela metodologia convencional pode contribuir com informações sobre a efetividade destes métodos. Caso sejam aceitos pelo sistema de vigilância em saúde, do Ministério da Saúde, podem se tornar mais uma opção de metodologia de análise para potabilidade de água no Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Panorama da água no Brasil e no mundo

A água potável tornou-se um importante fator de preocupação mundial. A avaliação química e microbiológica da água de diferentes fontes, como sistemas de tratamento públicos, poços, nascentes naturais e outros, é um passo crítico em qualquer programa de abastecimento de água, comercial ou humanitário (OMS, 2002).

Rios e lagos são os recursos hídricos mais acessíveis e disponíveis para consumo humano, mas correspondem a apenas 0,27% da água doce e perto de 0,007% da quantidade total de água no mundo. A água potável é apenas uma pequena parte do volume total de água armazenada nos principais reservatórios na Terra, que somam 1.386 milhões de km³, dos quais apenas 2,5% são de água doce. Calotas e geleiras polares armazenam as maiores quantidades de água doce do planeta, 68,7% (ONU, 2008).

O Brasil possui um território de 8.512.000 km² e uma população de 191.791 milhões de habitantes (OMS, 2009) distribuídos heterogeneamente em dimensões continentais, diversos climas e condições discrepantes de desenvolvimento econômico e social. Todos esses fatores resultam em críticas diferenças entre as suas regiões.

A Amazônia, por exemplo, armazena 73% da água doce disponível em uma região onde menos de 5% da população vive, enquanto apenas 27% dos recursos hídricos brasileiros estão disponíveis para 95% da população do país. 94,7% da população urbana está coberta por sistemas de abastecimento de água, mas aproximadamente 11 milhões de residentes urbanos não recebem água potável. No cenário da população rural, a situação é mais crítica: os sistemas de abastecimento de água atendem apenas

9% da população, sendo poços e nascentes as principais fontes de água de consumo humano (adaptado de MEIO AMBIENTE BRASIL, 2010).

Nesse cenário de contrastes e segundo o Ministério da Saúde, a doença diarréica aguda é a quarta principal responsável pela mortalidade infantil no Brasil. A ausência de água potável e sistemas de saneamento adequados são as principais causas de doenças intestinais (SAÚDE BRASIL, 2008).

2.2 Métodos para análises de Potabilidade

Diretrizes internacionais e nacionais adotadas, em geral, consideram como um dos principais indicadores da qualidade microbiológica da água a ausência de *Escherichia coli* (*E. coli*) em 100 mL de amostra (HEIJNEN e MEDENA, 2009). A legislação brasileira estabelece critérios para avaliação de parâmetros microbiológicos, físico-químicos e radioativos, baseados em níveis de ingestão que não ofereçam riscos para a saúde, descritos na Portaria MS nº 518 de 25 de março de 2004. Toda a água destinada ao consumo humano deve obedecer ao padrão de água potável. Esta norma define que haja ausência, preferencialmente de *E. coli*, ou coliformes fecais em 100 mL e que a contagem total de bactérias heterotróficas em placa estejam em níveis inferiores a 500 UFC/ mL (SAÚDE BRASIL, 2004).

A principal fonte de água potável provém de empresas de abastecimento e públicos ou privados, porém como fontes alternativas de abastecimento de água para consumo humano a Portaria nº 518/2004 inclui: todas as modalidades de abastecimento coletivo de água distintas do sistema de distribuição de água tais como fontes, poços, condomínios ou veículos de transporte (SAÚDE BRASIL, 2004).

2.2.1 Coliformes e *Escherichia coli*

O *Bacteriological Analytical Manual* define coliformes como bactérias Gram-negativas que produzem ácido e gás a partir de fermentação de lactose (FENG e WEAGANT, 1998).

A *E. coli* é o mais comum entre os coliformes da microbiota intestinal de animais homeotérmicos e sua presença pode estar associada principalmente com a contaminação fecal (HEIJNEN e MEDENA, 2009). Desde 1890, a espécie foi escolhida como o indicador biológico mais seguro para tratamento de água, porém, devido à dificuldade da execução dos métodos de análise, outros indicadores foram escolhidos para garantir a potabilidade da água, tais como, os coliformes totais e coliformes fecais ou termotolerantes (EDBERG et al. 2000).

A detecção e contagem de coliformes totais e/ou termotolerantes e *E. coli* têm sido tradicionalmente realizadas por ensaios de fermentação em tubos múltiplos e Número Mais Provável (NMP) ou membrana filtrante (MF) (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000). O método de referência utilizado pela União Européia para a detecção de coliformes e *E. coli* em amostras de água potável é o método de MF- ISO 9308-1:2000 - baseado no cultivo da membrana inoculada em Ágar Lactose Tergitol-7 – LTTC (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000). O método de MF 3016:2001 da *Finnish Standards Association* (SFS, 2001) é baseado no uso de placas com Ágar m-Endo LES, utilizado na Finlândia e em muitos outros países europeus.

Uma vez que os métodos tradicionais requerem um mínimo de 24 horas de incubação, seguido por procedimento de confirmação dos resultados positivos, que dura entre 24-48 horas, a necessidade de métodos rápidos aumentou (HIRULKAR e

TAMBEKAR, 2006; WANG e FIESSEL, 2008) e, durante as últimas décadas, diversos testes foram desenvolvidos (TAMBEKAR et al, 2007). Numerosos estudos comparativos demonstram que métodos rápidos disponíveis comercialmente, baseados em reações enzima-substrato, apresentam resultados comparáveis aos do método de referência de MF (HABASH e JOHNS, 2009; BELOTI et al. 2003).

Devido às diferenças nos princípios dos testes, na sensibilidade e especificidade, ou necessidade de procedimentos de testes de confirmação, os resultados dos métodos de ensaio podem interferir na qualidade microbiológica da água. É muito importante confirmar o desempenho e entender as limitações dos métodos antes de adotá-los (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000).

A técnica de membrana filtrante (MF), método bastante utilizado para análise de coliformes em água de consumo humano, é uma das metodologias descritas pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). A MF exige o uso de bomba de filtração a vácuo e membrana filtrante de 0.45µm, que deve ser inoculada em meio de cultura para coliformes, como por exemplo, o Ágar M-Endo Less. É desse modo, um teste quantitativo, mas não confirmatório. Se houver detecção de coliformes ou *E. coli*, a quantificação deve ser realizada para posterior acompanhamento.

2.2.2 Bactérias Heterotróficas

Bactérias heterotróficas são definidas como micro-organismos que necessitam de carbono orgânico para o crescimento. Diversos métodos conhecidos destinados a recuperar uma vasta gama de micro-organismos de água e são coletivamente conhecidos como contagem total em placa (SCHRAFT e WATTERWORTH, 2005).

A contagem padrão de bactérias heterotróficas em placa continua a figurar nas legislações sobre água em muitos países, como sendo utilizada para indicar a eficácia do processo de tratamento da água, indicação indireta da eliminação de patógenos (REASONER, 2004).

Para análise de bactérias heterotróficas, as metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), incluem técnicas com diferentes parâmetros: baixas e altas concentrações de nutrientes, temperaturas de incubação de 20° C, 28° C ou 35° C; diferentes formas de inoculação da amostra como plaqueamento em profundidade, espalhamento em superfície ou membrana filtrante e diferentes períodos de incubação, a partir de 24, 48, 72h, e inclusive de 5-7 dias, que fornecem uma grande flexibilidade na aplicação da análise de contagem total em placa.

A técnica de plaqueamento em profundidade utilizando o *Plate Count Agar* (PCA) é bastante utilizada no Brasil, com inoculação direta de 1 mL de água. Outros meios podem ser usados, como: *m-Heterotrophic Plate Count Agar* (m-HPC) para métodos por plaqueamento em profundidade, plaqueamento em superfície e membrana filtrante ou *Ágar Reasoner 2A* (R2A Ágar), baseado na técnica membrana filtrante (APHA, 2005).

2.2.3 Métodos 3MTM PetrifilmTM para Contagem de Bactérias Aeróbias, Coliformes e *E. coli*

Para justificar a introdução de um novo método, é sempre necessário realizar uma cuidadosa comparação com um ou mais métodos já estabelecidos em paralelo para a mesma amostra. Dado que cada método normalmente consiste em várias etapas, o

desempenho do método inclui muitos aspectos diferentes, por exemplo, um método poderia ser superior em especificidade, mas inferior em recuperação. (TAMBEKAR et al. 2008). Assim, um método poderá recuperar melhor os organismos-alvo, mas requerer confirmação dos resultados positivos. Para uso rotineiro é recomendável um método que não exija confirmação de casos positivos. Isso indica frequentemente à dificuldade de se especificar numericamente a superioridade de um método sobre o outro (OMS, 2002).

O método 3MTM Placas PetrifilmTM trata-se de um sistema de análise microbiológica pronto para uso, composto por meios de cultura desidratados, géis hidrossolúveis a frio, corantes e dois filmes plásticos. As 3MTM Placas PetrifilmTM para Contagem de Coliformes e *E. coli* (PFEC) contêm o meio Vermelho Violeta Bile – *Violet Red Bile* (VRB) como nutriente e gel hidrossolúvel a frio.

Os coliformes que crescem na placa PFEC apresentam coloração vermelha devido à presença do corante Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). O gás produzido pela fermentação da lactose é aprisionado ao redor da colônia pelo filme superior e indica colônias confirmadas (GANGAR et al. 1999).

As colônias de *E. coli* formam apresentam coloração azul, devido à reação do indicador de β -glucuronidase. Cerca de 97% das cepas de *E. coli* produzem β -glucuronidase, mas há exceções, como a *E. coli* O157: H7. 95% das cepas de *E. coli* produzem gás (GANGAR et al. 1999).

A 3MTM Placa PetrifilmTM para Contagem de Aeróbios (PFAC) contém meio *Plate Count Agar* (PCA), gel hidrossolúvel a frio e corante TTC, que facilita a contagem, sendo recomendada para contagem de bactérias aeróbias em alimentos e bebidas (CURIALE et al. 1990).

O uso das 3MTM Placas PetrifilmTM como meios de cultura para o crescimento bacteriano não está mencionado como metodologia preconizada para avaliação de água de consumo humano (APHA, 2005). Encontram-se na literatura indicações de que esta técnica apresenta resultados similares às metodologias atualmente utilizadas para a avaliação da qualidade microbiológica da água, que poderia ser adotada por se tratar de um método simples, padronizado e rastreável (BELOTI et al. 2003; SCHRAFT e WATTERWORTH, 2005; HORMAN e HANNIENA, 2006).

No entanto, nenhum dos estudos anteriores seguiu os requisitos da EPA para recomendar uma nova metodologia, além de não terem apresentado amostragens significativas. Aprovações internacionais, tais como as da *American Public Health Association* (APHA), *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *Association Francaise de Normalisation* (AFNOR) são geralmente aceitas em diferentes países (HORMAN e HANNIENA, 2006), mas o método 3M Petrifilm somente possui aprovações por estas instituições para matrizes alimentícias e não para água.

3. OBJETIVO GERAL:

Comparação de métodos para análise de coliformes, *E. coli* e heterotróficos em água de consumo humano.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Este estudo pretende comparar e avaliar o desempenho das 3M™ Placas Petrifilm™ para a Contagem de coliformes e *E. coli* com o método de referência de contagem de coliformes por membrana filtrante e, respectivamente, as 3M™ Placas Petrifilm™ AC com a técnica tradicional de contagem de heterotróficos em placa por profundidade, avaliando a sensibilidade e especificidade destes testes, seguindo o protocolo da EPA 821-B-03-2004 para análises microbiológicas de água potável.

5. MATERIAIS & MÉTODOS:

5.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado seguindo os critérios do protocolo 821-B-03-004 (EPA, 2004), somado à necessidade de análise de fontes alternativas de água de consumo humano, descrita na MS nº. 518/2004 (SAÚDE BRASIL, 2004), assim, priorizaram-se as análises de água bruta em conjunto com água tratada e análise de água de poços e fontes como matrizes de fontes alternativas.

Na tabela 1 podem-se verificar os tipos de matrizes de água, os pontos de coleta, número de alíquotas e unidades amostrais analisadas.

Tabela 1: planejamento das coletas

	Pontos de Coleta	Alíquotas	Repetições	Total de unidades amostrais
Água de abastecimento	2	20	2	80
Água de poços	2	20	1	40
Água de fontes	2	20	1	40
Total de replicatas			160	

5.2 Localização e data das coletas de amostras:

As amostras de água de consumo humano tratadas foram coletadas em recipientes estéreis, contendo 0,1mL de solução de tiosulfato de sódio 1,8%: 100 mL (SILVA et al. 2000) para a inativação do cloro residual.

As amostras naturalmente contaminadas foram coletadas em recipientes estéreis e eram provenientes de três diferentes fontes: água bruta, dos rios Atibaia e Jaguari, que abastecem estações de tratamento da região de Campinas; água de dois poços privados e água de duas fontes, uma privada e outra pública, de dois pontos diferentes na região de Campinas/SP.

O volume coletado foi de 1 Litro (L) de água bruta e 3 L de água tratada, em cada ponto, suficiente para a realização de todas as análises. As amostras foram transportadas sob refrigeração e analisadas em até 24 horas.

No momento da coleta, as amostras foram identificadas, informação que foi útil para caracterizar a matriz e identificar potenciais interferências, seguindo as recomendações do protocolo 821-B-03-004 (EPA, 2004):

1 - Localização do ponto de coleta por Sistema de Posicionamento Global - *Global Positioning System* – GPS (Garmin™).

2 - Fonte de água (água de abastecimento de poços ou fontes).

As análises microbiológicas das amostras foram realizadas no Laboratório de Toxinas Microbianas do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A identificação, locais de coleta, data e localização por GPS estão compilados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2: identificação das amostras.

	Local de Coleta das Amostras	Data	Localização por GPS
1	Casa R. Luverci P. de Souza, 818	13/08/2009	S22°48.927´ W47°04.672´
2	Rio Atibaia	13/08/2009	S22°57.485´ W46°59.688´
3	Casa R. Luverci P. de Souza, 818	01/09/2009	S22°48.927´ W47°04.672´
4	Rio Atibaia	01/09/2009	S22°57.485´ W46°59.688
5	Casa R. Luverci P. de Souza, 818	15/09/2009	S22°48.927´ W47°04.672´
6	Rio Atibaia	15/09/2009	S22°57.485´ W46°59.688
7	Água da Bica	30/09/2009	S33°86.293´ W47°05622´
8	Agua da Fonte	07/10/2009	S22°48.889´ W 047°04.665´
9	Água do poço Chácara do Dedé	04/11/2009	S22°47.905´ W 047°04.541´
10	Água do poço Chácara da Luciane	04/11/2009	S22°40.482´ W47°04,541´
11	Água tratada Paulínia	11/11/2009	S22°47.538´ W47°.08.111´
12	Rio Jaguari	11/11/2009	S21°20.845´ W 049°28.751´
13	Água tratada Paulínia	18/11/2009	S22°47.538´ W47°.08.111´
14	Jaguari	18/11/2009	S21°20.845´ W 049°28.751´

5.2.1 Água bruta e água de abastecimento:

Para as análises de bactérias heterotróficas e coliformes, *E. coli*, foram coletadas amostras de dois pontos de água bruta de dois rios que abastecem as estações de tratamento da região de Campinas/SP, antes dos pontos de captação.

As amostras foram separadas em 10 alíquotas que foram utilizadas como repetições, perfazendo 80 unidades amostrais no total, conforme elucidado abaixo:

Rio Atibaia: 2 pontos de coleta x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 40 unidades amostrais (EPA, 2004).

▪ Rio Jaguari: 2 pontos de coleta x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 40 unidades amostrais (EPA, 2004).

Na figura 1 é possível visualizar o local de coleta no do rio Atibaia antes do ponto de captação da estação de abastecimento.



Figura 1: Local de coleta de água bruta, próximo ao ponto de captação da estação de abastecimento - Rio Atibaia

Na figura 2 está o local de coleta no do rio Jaguari antes do ponto de captação da estação de abastecimento.



Figura 2: Local de coleta de água bruta próximo ao ponto de captação da estação de abastecimento - Rio Jaguari

5.2.2 Água de Poços:

Foram coletadas amostras de 2 poços particulares e cada amostra coletada foi dividida em 10 alíquotas, totalizando 40 análises.

- Poço Chácara do Dedé: 1 poço x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 20 unidades amostrais (EPA, 2004).

- Poço Chácara Luciana 1 poço x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 20 unidades amostrais (EPA, 2004).

Na figura 3 é possível visualizar o local de coleta da água de poço Chácara do Dedé.



Figura 3: Local de coleta de água de poço privado - Poço chácara do Dedé

5.2.3 Água de Fontes:

Foram coletadas amostras de 2 fontes, 1 pública e 1 particular e cada amostra foi dividida em 10 alíquotas.

- Fonte Água da Fonte: 1 fonte privada x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 20 unidades amostrais (EPA, 2004).

- Fonte Bica do Taquaral: 1 fonte pública x 10 alíquotas x 2 métodos de análise = 20 unidades amostrais (EPA, 2004).

Na figura 4, abaixo, é possível verificar as más condições de conservação do ponto de captação na Água da Fonte. Em seguida, na figura 5 observa-se a fonte Bica do

Taquaral, local onde diversos moradores buscam água todos os dias, em galões plásticos, sem controle sanitário adequado.



Figura 4: Local de coleta de água de fonte privada - Água da Fonte



Figura 5: A – área onde se localiza fonte pública Taquaral; B – local de captação de água, sem proteção ou controle.

5.3 Análises Físico-químicas:

As seguintes análises foram realizadas no laboratório de Saneamento e Ambiente da Faculdade de Engenharia Civil, UNICAMP, conforme os parâmetros descritos no protocolo EPA 821-B-03-2004, em menos de 24h após a coleta das amostras de água bruta e tratada, transportadas e mantidas sob refrigeração:

- pH (ThermoOrion™ 410)
- Turbidez (HACH™ 2100N)
- Carbono orgânico total (Shimadzu™ 5000 A)
- Cloro Livre e total residual - método DPD colorimétrico (HACH™ DR 4000U)
- Temperatura - medida no momento da coleta (EPA, 2004).

5.4 Contaminação das amostras:

Para comparação de metodologias é necessário obterem-se resultados positivos, no entanto, espera-se que amostras de água potável não contenham os micro-organismos de interesse (*E. coli* e heterotróficos acima de 500 UFC/mL). Portanto, foi necessário contaminar as amostras de água de consumo humano utilizando como matriz água dos pontos de captação dos sistemas de abastecimento, antes da cloração (EPA, 2004).

Para definição da diluição correta para obtenção de contagens dos micro-organismos alvos na faixa ideal de leitura, foram realizados experimentos preliminares, onde se determinou a proporção de 1:10 de água bruta: água tratada (EPA, 2004). Assim, os resultados considerados neste estudo foram obtidos através de soluções contendo 200 mL de água bruta para 1800 mL de água tratada, cujo cloro já havia sido inativado com tiosulfato de sódio 1,8% no momento da coleta. As amostras de água de poços e fontes utilizadas estavam naturalmente contaminadas.

5.5 Determinação do Tempo e Concentração de Cloro adequada:

As amostras contaminadas foram submetidas a estresses por cloração à temperatura ambiente, em condições semelhantes às realizadas em estações de tratamento de consumo humano.

Durante o estudo inicial, foram realizadas coletas de 4 amostras de água bruta, dos Rios Atibaia e Capivari, antes do ponto de captação das estações de abastecimento e coletas de amostras de água de consumo humano, contaminadas (1: 10) foram expostas a diferentes concentrações de cloro livre, variando de 0,1 a 0,5 mg/L de Cloro livre, como recomendado pelo método 821-B-03-004 (EPA, 2004) como valores suficientes para causar estresse, em intervalos de exposição de 5, 10, 20 e 30 minutos.

Todas as alíquotas foram inoculadas em 3M™ Placa Petrifilm™ para contagem de aeróbios (PFAC) e na 3M™ Placa Petrifilm™ para contagem de coliformes e *E. coli* (PFEC), em diluições decimais seriadas. Estas amostras foram utilizadas para a definição da concentração ideal x tempo de exposição a fim de verificar a presença e a concentração dos micro-organismos alvo e definir o protocolo a ser utilizado em todas as amostras, até a redução da contagem inicial de 10^3 - 10^5 UFC/ 100 mL para 20-10 UFC/ 100 mL (EPA, 2004). Estes resultados foram descartados, pois muitas alíquotas não apresentavam contagens, por excesso de hipoclorito de Cloro e outras não diminuíam a população até a faixa ideal de contagem preconizada (EPA, 2004).

Padronizou-se assim que a cada amostra coletada fosse realizada a quantificação em espectrofotômetro da quantidade necessária de solução de hipoclorito de Cloro 12% necessária para obtenção de 0,1 a 0,2 mg/L de Cloro livre na solução, considerado suficiente para gerar estresse, sem causar morte da população adicionada (EHRENFELD 1997), utilizando o método DPD colorimétrico (HACH™ DR 4000U).

5.6 Análises Microbiológicas de Bactérias Heterotróficas em Placa:

O desempenho das 3MTM Placas PetrifilmTM para Contagem de Aeróbios - 3MTM PFAC foi comparado com o método convencional de contagem de bactérias heterotróficas em placas de Petri descartáveis, por plaqueamento em profundidade, contendo o meio Plate Count Agar (PCA) da marca BDTM - DIFCOTM. Em ambas as metodologias, foi inoculado 1 mL de amostra, com 10 replicatas por amostra, por método.

As placas foram incubadas por 48 horas a 35° C e ao final do período foram realizadas as leituras e os registros dos resultados (CURIALE et al. 1990 e APHA, 2005), conforme demonstrado na figura 6.

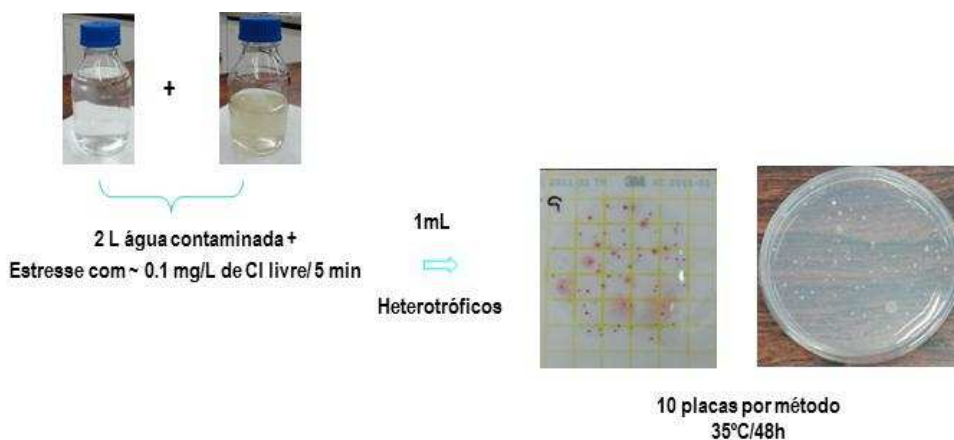


Figura 6: Diagrama das etapas de análise de bactérias heterotróficas para água bruta. Para amostras de poços e fontes não foi realizada a contaminação, pois as amostras apresentavam a microbiota - alvo naturalmente.

5.7 Análises Microbiológicas de Coliformes Totais e *E. coli*:

100 mL de água de cada amostra foram filtrados pelo método de membrana filtrante vinte vezes consecutivas, através de sistemas de filtração (Nalgene™) conectados a uma bomba de vácuo (Tecnal™), utilizando membranas filtrantes de 47 mm de diâmetro de acetato de celulose com porosidades de 0,45 µm (Millipore™). O objetivo foi analisar as amostras em ambas as metodologias, com 10 replicatas por método. Deste modo, 10 membranas por amostra foram transferidas para 10 placas de 3M™ PFEC - pré-hidratadas com 1 mL de solução salina 0,9%, com antecedência mínima de 1 hora antes da inoculação da membrana – e outras foram transferidas para placas de Petri descartáveis contendo M-Endo Ágar (Difco™) e preparadas com 24h de antecedência. Ambas as placas foram incubadas a 35°C. As placas contendo M-Endo Ágar foram contadas em 24h e as placas de PFEC em 48h. Todos os resultados foram registrados.

5.7.1 Análise confirmatória de coliformes:

Para confirmar as colônias obtidas, das vinte alíquotas filtradas para cada tipo de amostra de água, selecionaram-se quatro delas que apresentaram crescimento de *E. coli* aleatoriamente, e de cada uma foram confirmadas até dez colônias para cada método, utilizando o sistema de identificação BBL Cristal Enteric/ Nonfermenter ID Kit (BD™) (EPA, 2004), como representado na figura 7.

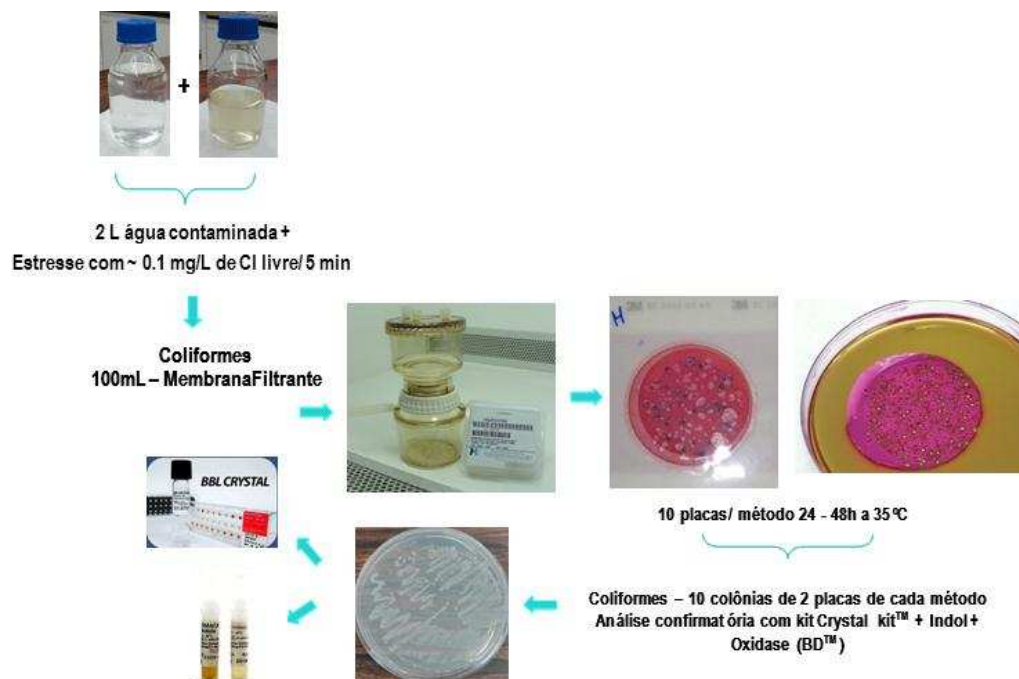


Figura 7: Diagrama das etapas de análise de coliformes e *E. coli* para água bruta. Para amostras de poços e fontes não foi realizada a contaminação, pois as amostras apresentavam a microbiota - alvo naturalmente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises Físico-Químicas:

O desinfetante químico mais comumente utilizado na desinfecção para produção de água potável é o Cloro (Cl_2), líquido ou gasoso. O Cloro presente na água, na forma de HClO ou ClO^- , é denominado Cloro livre disponível, que é a medida do poder de oxidação de um composto de cloro.

Para melhor compreender as interações químicas nas amostras analisadas foram avaliados o pH, temperatura, turbidez, Carbono Orgânico Total (COT), concentração de Cloro (Cl) livre e total, logo após a coleta das amostras (EPA, 2004). Os resultados foram compilados na tabela 3:

Tabela 3: Resultados das análises físico-químicas

Amostra	pH	Temperatura	Turbidez	COT	Cl Livre	Cl Total
		(°C)	(UT)		(mg/L)	(mg/L)
1	7,3	28	0,3	3,902	0,49	2,88
2	7,3	25	53	6,87	0	0
3	7,1	21,5	0,27	4,56	0,23	2,32
4	7	27	12,6	6,56	0	0
5	7,3	22	0,18	6,46	0,3	2,69
6	6,61	24	67	9,16	0	0
7	5,85	23	0,29	4,18	0,02	0,02
8	5,32	27	0,28	1,25	0	0

Continuação da Tabela 3: Resultados das análises físico-químicas

9	5,47	27	0,46	2,82	0	0
10	7,97	25	0,659	2,07	0	0
11	6,86	27	2,43	4,41	0,36	0,48
12	6,96	26	209	20,8	0	0
13	6,65	27	4,1	5,08	0,67	0,74
14	7,22	26	408	16,01	0	0

Legenda:

(°C) – Graus Celsius

UT – Unidades de Turbidez

COT – Carbono Orgânico Total

Cl = Cloro

mg/L = miligramas por Litro

Quando a água contém amônia ou compostos amoniacaais, o HClO combina-se com tais compostos e forma cloraminas (NH_2Cl) e compostos amoniacaais, sendo o teor de Cloro livre denominado cloro livre combinado.

Quando há amônia de origem orgânica na água natural, a adição de Cloro concorre para a formação de cloraminas orgânicas, que apresentam baixo poder de desinfecção.

As amostras de água bruta apresentaram elevados valores de carbono orgânico total (COT), técnica freqüentemente utilizada para monitorar matéria (FONSECA et al., 2006). A presença de matéria orgânica pode ser correlacionada com a presença de

compostos nitrogenados, que interferiram na padronização da concentração de cloro livre disponível, utilizado para simular o estresse nos micro-organismos alvo.

Com o efeito da sazonalidade ambiental, do intenso regime de chuvas registradas no ano de 2009 e variável volume de descarga de dejetos nas fontes de água bruta, houve diferentes interferências na composição química da água bruta, o que não tornou possível a padronização do volume de solução de Hipoclorito de cloro 12% utilizada como oxidante para todas as amostras, para simular o estresse do tratamento das estações de abastecimento.

A temperatura da água, o pH da amostra e o tempo decorrido após adição de cloro na água contendo amônia interferem nesta relação $\text{Cl}_2/\text{NH}_3 - \text{N}$, sendo importantes fatores a serem considerado na formação de cloraminas, que interferem na desinfecção. Assim, foi muito importante observar estas interações para poder viabilizar este projeto.

Portanto, para cada amostra, foi necessário dosar a presença de cloro livre até atingir o *breakpoint*, ponto onde ocorre oxidação de toda a amônia e após aumento da adição de Cloro houve aumento do Cloro livre disponível (DANIEL, 2001), que pôde então agir como agente desinfetante adicionando-se pequenos volumes da solução de hipoclorito cloro 12% e medindo a reação em espectrofotômetro até obtenção 0,1-0,2 ppm Cl livre/L. Concentrações acima de 0,2 mg/L de Cloro livre levavam à eliminação das colônias de *E. coli* e diminuíram muito as contagens de coliformes totais, mas não eliminavam totalmente as colônias de bactérias heterotróficas.

A figura 8 demonstra a relação entre a concentração de Cl_2 e a formação de cloro livre e cloraminas.

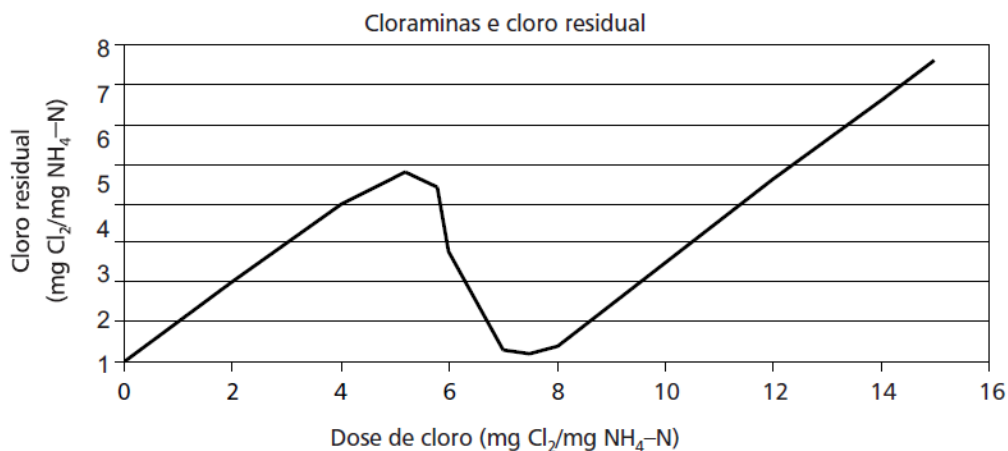


Figura 8 - Distribuição das espécies cloraminas em função da razão Cl₂: N (Daniel, 2001).

A Portaria MS n.º 518 (SAÚDE BRASIL, 2004) cita que as amostras de água de consumo humano devem estar ter pH entre 6 e 9,5. Todas as amostras coletadas atenderam a este parâmetro, no entanto, pôde-se observar que as amostras de fontes e um dos poços apresentaram pH <5.9, o que pode ter interferido no desempenho do método PetrifilmTM.

Com relação ao parâmetro presença de Cloro livre, todas as amostras oriundas de estações de abastecimento atenderam aos parâmetros de 0,2 a 2,0 mg/L. É interessante observar que as amostras de água de consumo humano oriundas de estações de tratamento devem apresentar turbidez abaixo de 1 e 2 UT, em 95% das amostras, com valor máximo permitido de 5 UT e nas amostras coletadas em Paulínia observaram-se valores muito próximos ou acima deste limite (SAÚDE BRASIL, 2004).

6.2 Análises Microbiológicas:

6.2.1 Contagem total de bactérias heterotróficas:

Os resultados das contagens de bactérias heterotróficas obtidas após o estresse com cloro para amostras de água de abastecimento e amostras de poços e fontes foram transformados em logaritmos de base 10 (SCHRAFT e WATTERWORTH, 2004) e compilados na tabela 4, em anexo.

6.2.2 Descritivo Estatístico para análise de bactérias heterotróficas:

Os dados sofreram transformação logarítmica, exponencial, evitando distorção dos dados por causas especiais.

Para análises de bactérias heterotróficas a recuperação foi calculada conjuntamente para as 3 matrizes, pois os resultados individuais não apresentaram diferenças, o que aumentou o número de amostras consideradas, gerando uma maior representatividade (EPA, 2004).

O coeficiente de variação (CV) foi calculado através da relação entre o desvio padrão e a média, e expresso como percentual, para cada matriz e método individualmente, utilizando o software MINITAB® (EPA, 2004).

A avaliação da normalidade foi realizada com testes estatísticos como teste de Kolmogorov-Smirnov. A avaliação da precisão foi realizada com o teste F e como a normalidade não foi atingida, o teste não paramétrico Levene foi utilizado, com base no desvio absoluto da média (EPA, 2004).

Os dados analisados comparando os resultados de contagens de bactérias heterotróficas com amostras das 3 diferentes matrizes de água podem ser visualizados na tabela 5, a seguir:

Tabela 5: Análise conjunta das 3 matrizes de água para contagem de total de bactérias heterotróficas – 3MTM PFAC x PCA.

Variáveis	N	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Mediana
LOG PFAC (UFC/mL)	90	2,0702	0,4094	19,78	2,0294
LOG PCA (UFC/mL)	90	1,9193	0,4945	25,76	2,0212

Pode-se verificar que houve diferenças entre as contagens nos dois métodos, considerando os resultados de Média, em logaritmos, onde em algumas matrizes existe uma tendência ao método 3MTM PFAC apresentar contagens mais elevadas do que o método PCA e em outras, o oposto.

A precisão do método 3MTM PFAC foi considerada superior, já que apresentou um coeficiente de variação inferior ao do método PCA (EPA, 2004).

Assim, observa-se no gráfico 1, abaixo, que ambos os métodos variaram bastante.

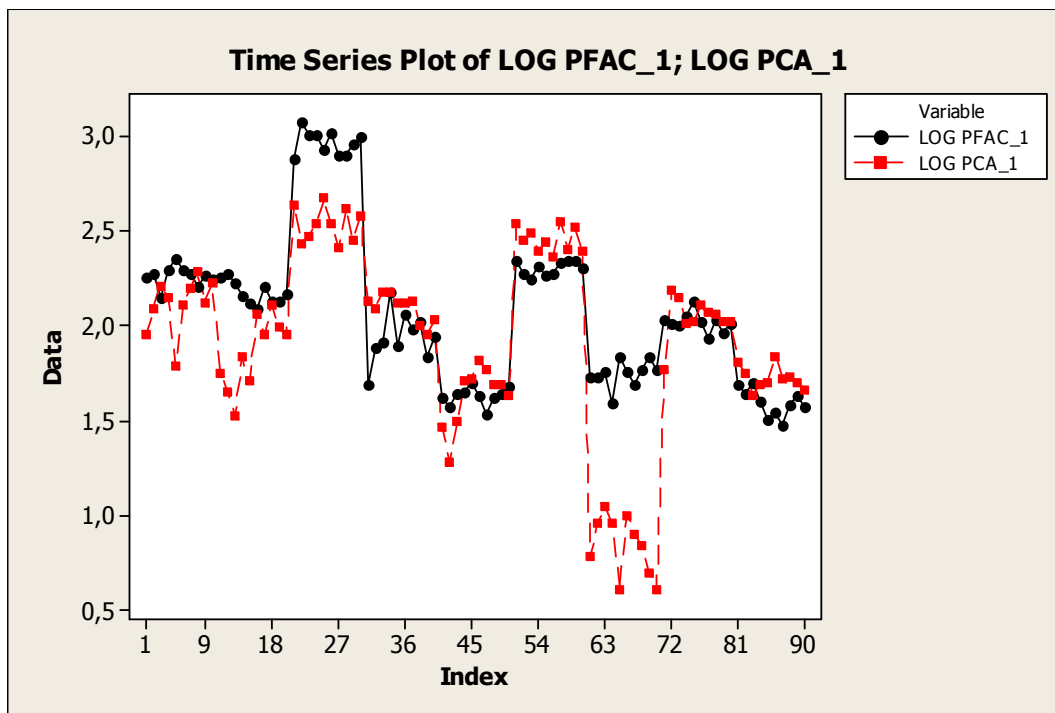


Gráfico 1: Análise conjunta das contagens em logaritmos, comparando os métodos 3MTM PFAC x PCA para as diferentes matrizes.

Foi analisada a normalidade dos resultados de contagens de bactérias heterotróficas em placas de PFAC e pode-se observar que os dados não são normais, por não apresentarem um sentido linear, como pode ser observado no gráfico 2. Assim, concluiu-se que análises estatísticas não-paramétricas deveriam ser utilizadas na avaliação dos dados.

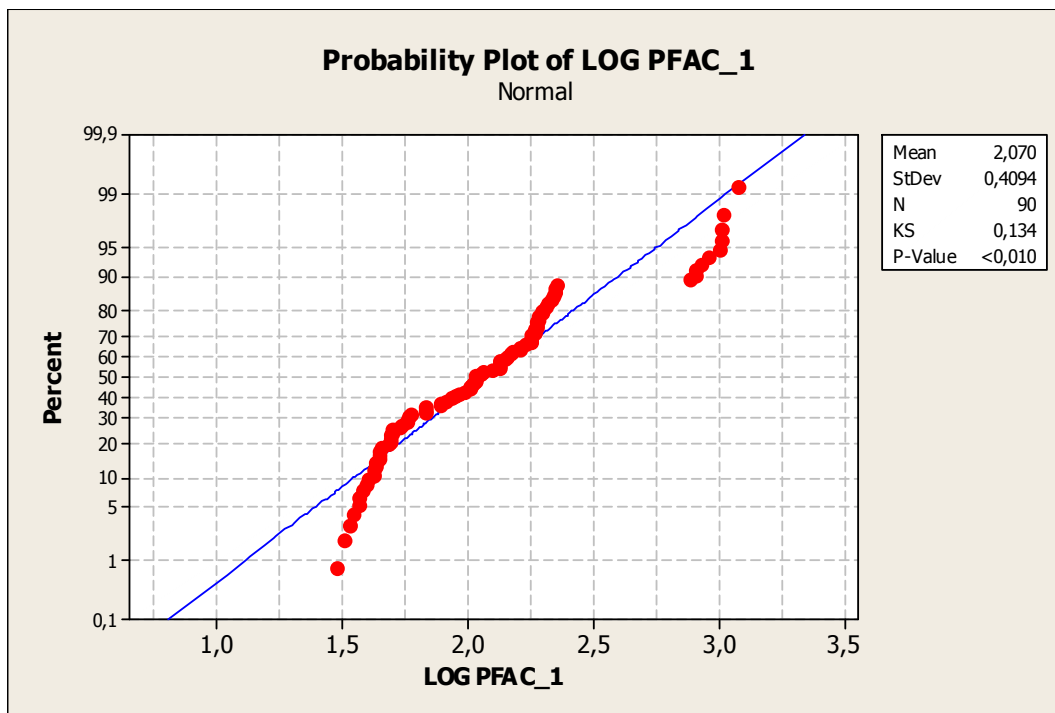


Gráfico 2: Análise da normalidade dados em logaritmos dos resultados das contagens de bactérias heterotróficas com o método 3MTM PFAC.

Foi analisada a normalidade dos resultados de contagens de bactérias heterotróficas em placas de PCA e novamente pode-se observar que os dados não eram normais, por não apresentarem um sentido linear, como pode ser observado no gráfico 3. Assim, concluiu-se que análises estatísticas não-paramétricas deveriam ser utilizadas na avaliação dos dados.

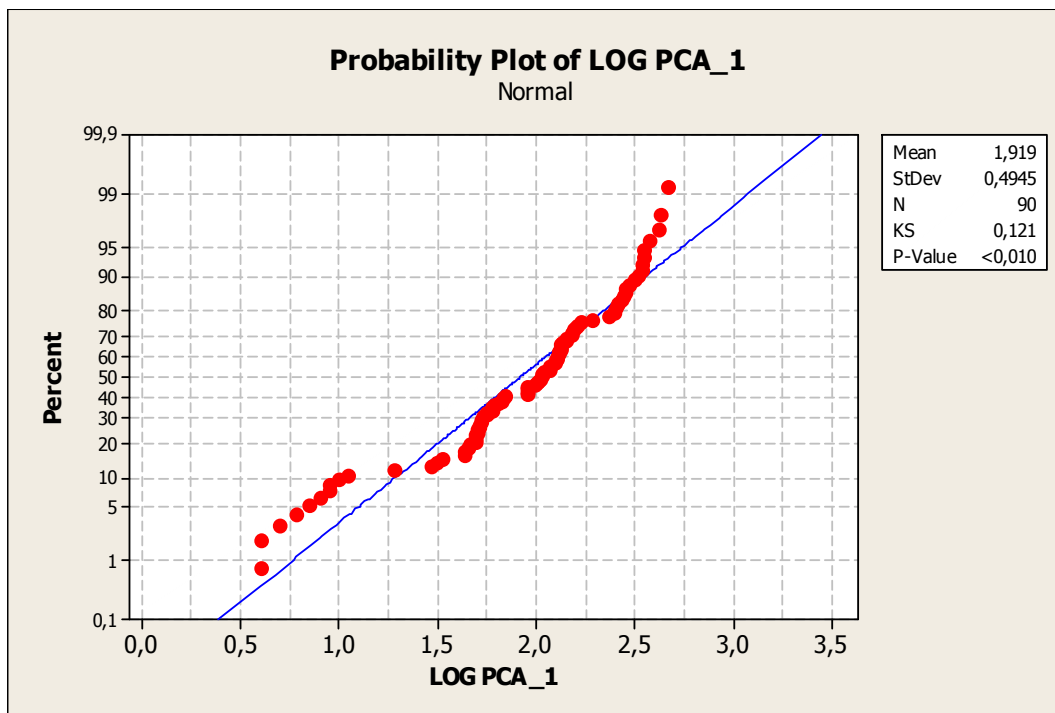


Gráfico 3: Análise da normalidade - dados dos resultados com o método contagem total de bactérias em placa - PCA.

Foram realizados testes para verificação da variância dos resultados, comparando os resultados do método 3MTM PFAC e PCA, onde pôde-se visualizar na parte superior do gráfico 4 que os resultados do método 3MTM PFAC apresentam um menor intervalo de confiança, o que significa que os resultados variaram menos para este método do que para o método de plaqueamento em PCA.

Compararam-se também as medianas dos resultados, onde é possível verificar na parte inferior do gráfico 4, que as contagens em ambos os métodos foram bastante próximas, com medianas muito semelhantes.

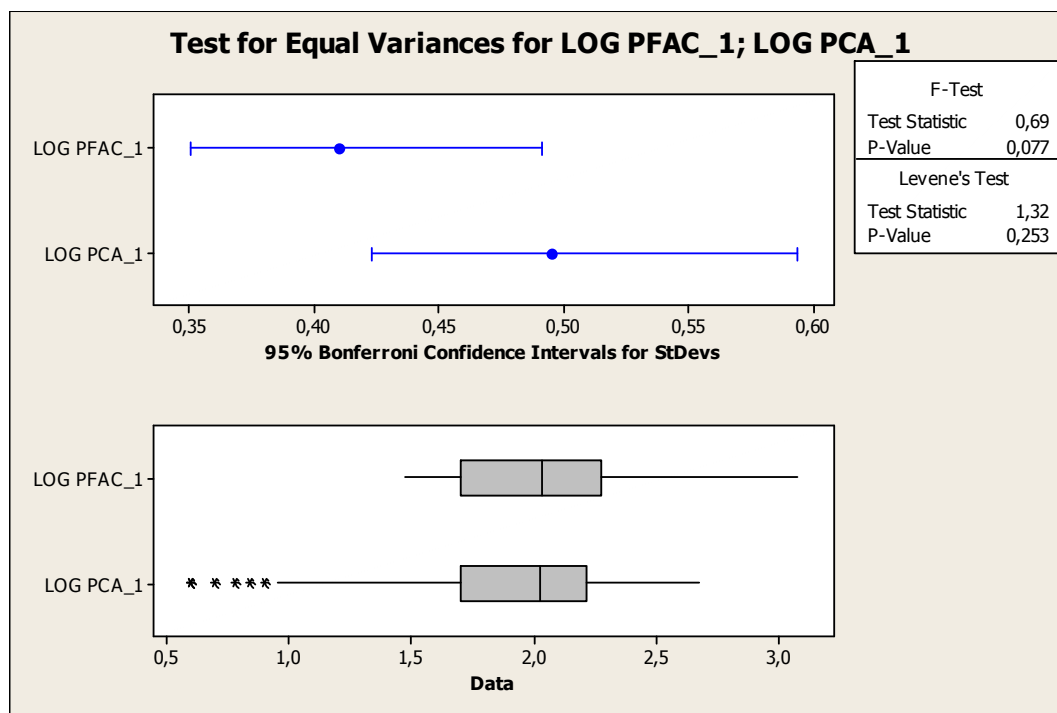


Gráfico 4: Teste de variâncias iguais comparando os resultados das contagens em logaritmos para os métodos 3MTM PFAC x PCA.

Com o teste de Bonferroni, utilizando um intervalo de confiança 95% foi possível verificar que o método 3MTM PFAC apresentou menor desvio padrão do que o método PCA, confirmando a menor variação entre as contagens de bactérias heterotróficas no método 3MTM PFAC. Os resultados do teste podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6: Teste de Bonferroni - Intervalo de confiança 95% para desvio padrão.

Método	N	Mínimo	Desvio Padrão	Máximo
LOG PFAC (UFC/mL)	90	0,350351	0,409427	0,491296
LOG PCA(UFC/mL)	90	0,423124	0,494471	0,593345

Para avaliar a correlação entre os métodos, foi realizado o Teste Levene, onde se obteve um resultado igual a 1,32 e p-valor igual a 0,253. Neste teste consideram-se correlações positivas quando o p-valor é maior do que 0,05, sendo assim, pode-se concluir que há correlação entre o método 3MTM PFAC e PCA.

Para avaliação da recuperação média dos métodos utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, já que os dados não eram normais. Este teste compara as medianas dos resultados de ambos os métodos analisados, compiladas na tabela 7. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95,0% e obteve-se um resultado do teste W igual a 8455,5. Assim, o resultado não pôde ser rejeitado, pois o W é maior do que 8145,0.

A média, desvio padrão e mediana foram muito próximos para ambos os métodos, demonstrando que não houve diferença estatística para contagens de bactérias heterotróficas com o método 3MTM PFAC, quando comparado ao método PCA, demonstrando-se que os métodos têm o mesmo poder de recuperação.

6.3 Resultados para Contagem de Coliformes e *E. coli*:

As análises dos dados das amostras de água de abastecimento tratada contaminadas com amostras oriundas dos rios Atibaia e Jaguari foram realizadas separadamente das amostras de poços e fontes, naturalmente contaminadas, pois apresentaram algumas contagens muito diferentes para os métodos.

6.3.1 Resultados para Contagem de Coliformes e *E. coli* para água de abastecimento:

Compararam-se as contagens nas 3MTM Placas Petrifilm para Contagem de Coliformes e *E. coli* (3MTM PFEC), separando-se a contagem de *E. coli* e de coliformes, que apresentam diferentes colorações de colônias na segunda coluna da tabela 08, a soma das contagens totais de coliformes totais e contagens de *E. coli* na terceira coluna e as contagens de colônias verde brilhantes, características de contagens de coliformes totais, encontradas nas placas de M-Endo Ágar Less (Endo) na quarta coluna.

Os resultados das contagens em UFC/mL foram transformados em logaritmos de base 10 (SCHRAFT e WATTERWORTH, 2004) e estão descritos na tabela 07, em anexo.

Pode-se observar que em algumas amostras não houve crescimento de *E. coli* no método 3MTM PFEC.

O método M-Endo Agar (Endo) não é seletivo para *E. coli* e sim para coliformes totais, que são caracterizados por colônias verde-metálicas. Assim, para as confirmações bioquímicas, foram isoladas somente as colônias azuis com bolhas de gás das placas 3MTM PFEC e colônias verde-metálicas das placas de Endo.

De acordo com WANG e FIESSEL (2008), há muitas vantagens na utilização do método de MF, no entanto, utilizando o meio m-Endo ágar (Endo) para análises microbiológicas para água de consumo humano enumeram-se somente coliformes totais, que ainda podem estar superestimados, pela presença de microbiota contaminante, causando resultados falsos-positivos como se observou neste estudo.

Em casos de positividade com o método Endo, é recomendada a utilização de métodos confirmatórios, usualmente baseados na reação de MUG, que acabam

consumindo muito tempo. Esta demora pode expor as estações de tratamento, que precisam aguardar vários para obter o resultado da confirmação da contaminação após a coleta da amostra. Portanto, é muito interessante a utilização de métodos rápidos, alternativos, que enumerem simultaneamente *E. coli* e coliformes totais, que não necessitem de procedimentos confirmatórios (WANG e FIESSEL, 2008).

6.3.2 Resultados dos testes de confirmação bioquímica de *E. coli* e coliformes:

Foram considerados positivos os resultados para as colônias confirmadas com o sistema de identificação BBL Cristal Enteric/ Nonfermenter ID (BD™) como *E. coli* para o método 3M™ PFEC e pertencentes ao grupo coliforme total para o método Endo, segundo a classificação do grupo coliformes do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Os resultados das confirmações estão compilados na tabela 08, em anexo, sendo realizados em colônias oriundas de 2 placas escolhidas aleatoriamente para cada método (placa 1 e 2).

Não foi possível calcular a especificidade e sensibilidade dos métodos, pois não foram realizados experimentos em paralelo com um terceiro método (EPA, 2004).

Pode-se observar que algumas colônias típicas de *E. coli* no método 3M™ Petrifilm™ não foram confirmadas como *E. coli*, sendo identificadas como pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Aeromonas*, apesar do cuidado para não haver contaminação no momento do isolamento da colônia, podem ter ocorrido falhas, sendo que a maioria das colônias apresentaram resultados negativos para oxidase e positivos para Indol, como o esperado para esta espécie.

Houve também falsos-positivos no método M-Endo Ágar, mas este não é um método específico para *E. coli*, e sim para coliformes totais (APHA, 2005). Assim,

consideraram-se falso-positivos somente as amostras dos gêneros *Serratia* e *Aeromonas*, o que gerou uma tendência a considerar o método M-Endo Ágar mais sensível.

Muitas bactérias além da *E. coli*, como linhagens de *Aerococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Shigella* podem expressar atividade de b-glucuronidase, e caso degradem lactose, podem gerar resultados falsos-positivos (CHAO, 2005).

Encontram-se na literatura relatos de excelente sensibilidade e especificidade do método PFEC em comparação com outros métodos convencionais (SCHRAFT e WATTERWORTH, 2004).

6.3.3 Descritivo Estatístico para análise de Coliformes e *E. coli* para água de consumo humano:

Os dados sofreram transformação logarítmica, exponencial, evitando distorção dos dados por causas especiais.

Para as análises de coliformes, a recuperação foi calculada separadamente para cada matriz, determinando o desempenho de cada método (EPA, 2004).

O coeficiente de variação foi calculado através da relação entre o desvio padrão e a média, e expresso como percentual, para cada matriz e método individualmente, utilizando o software MINITAB®.

A avaliação da normalidade foi realizada com testes estatísticos como teste de Kolmogorov-Smirnov. A avaliação da precisão foi realizada com o teste F e como a normalidade não foi atingida, o teste não paramétrico Levene foi utilizado, com base no desvio absoluto da média (EPA, 2004).

Os dados analisados comparando os resultados de contagens de coliformes e *E. coli* com amostras de água de consumo humano, contaminadas com água bruta e estressadas com cloro podem ser visualizados na tabela 09.

Pôde-se verificar que houve poucas diferenças entre as contagens nos dois métodos, considerando os resultados de Média e mediana, em logaritmos, assim, para água de abastecimento, existe uma tendência do método 3MTM PFEC apresentar contagens mais elevadas do que o método ENDO.

Tabela 09: Estatística descritiva para água de consumo humano comparando os métodos 3MTM PFEC x M-Endo Ágar.

Variável	N	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Mediana
LOG PFEC (UFC/mL)	50	1,8805	0,1585	8,43	1,9085
LOG ENDO (UFC/mL)	50	1,8272	0,2908	15,91	1,8603

É interessante observar que o método 3MTM PFEC apresentou menor desvio padrão e valores 50% menores de coeficiente de variação, demonstrando ser um método com maior precisão do que o método ENDO.

Observa-se no gráfico 5, abaixo, que o método 3MTM PFEC teve menor variação em comparação com o método ENDO, com menos picos e maior linearidade.

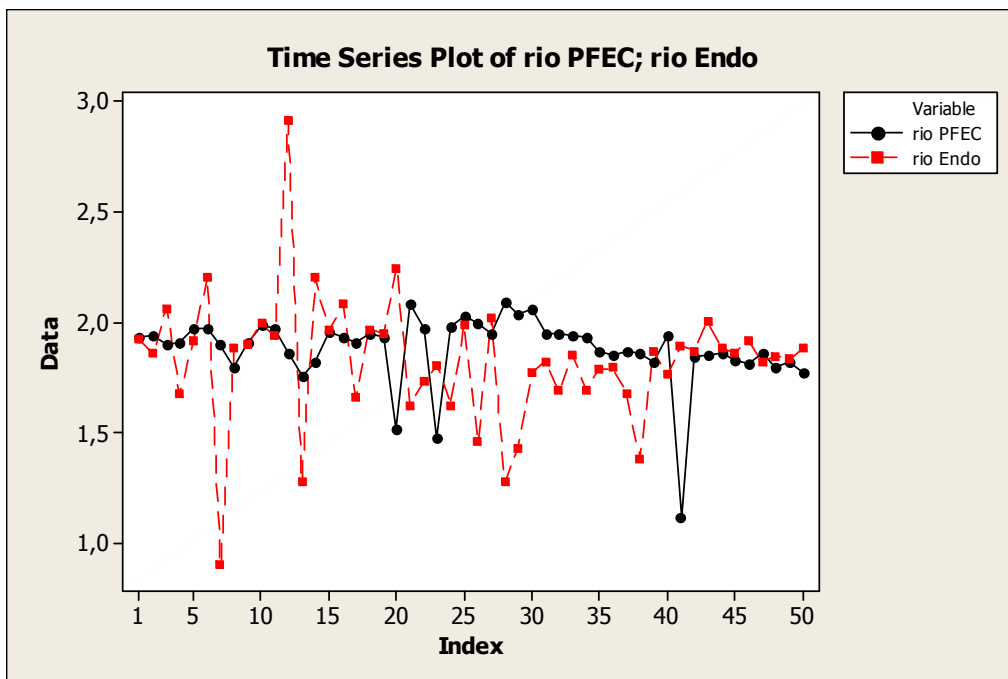


Gráfico 5: Análise conjunta dos dados em logaritmos, comparando os métodos 3MTM PFEC x M- Endo Ágar para amostras de água de consumo humano.

Foi analisada a normalidade dos resultados de contagens de coliformes e *E. coli* analisadas com o método 3MTM PFEC e pode-se observar que os dados não são normais, por não apresentarem um sentido linear, como pode ser observado no gráfico 6. Com base nesta observação concluiu-se que análises estatísticas não-paramétricas deveriam ser utilizadas na avaliação dos dados.

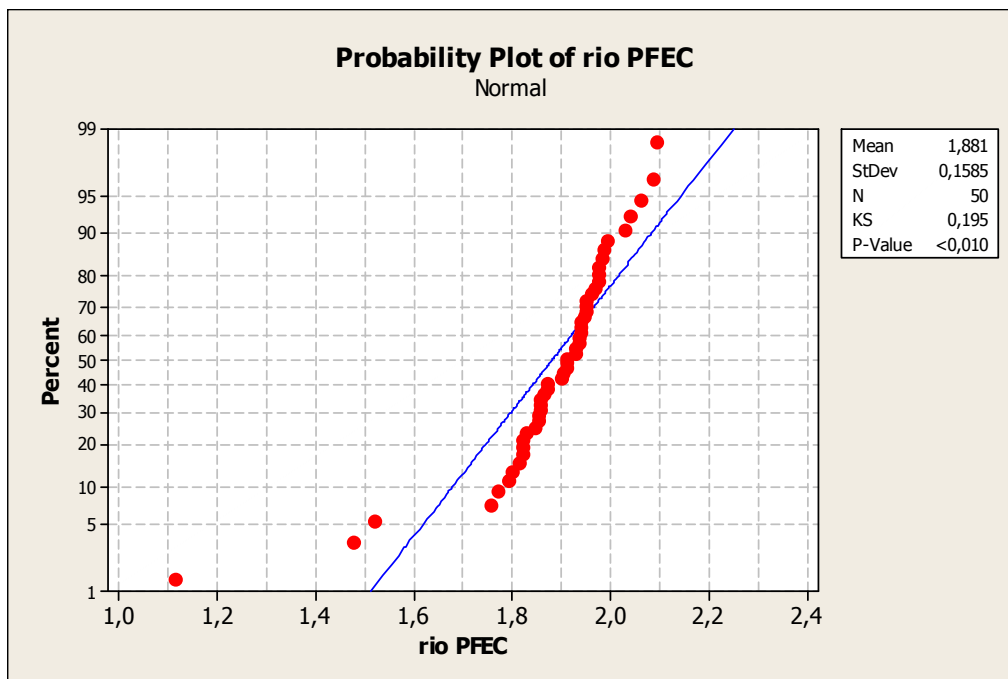


Gráfico 6: Análise da normalidade dos dados para amostras de água de consumo humano, analisadas com o método 3MTM PFEC.

Foi analisada a normalidade dos resultados de contagens de coliformes totais em placas de ENDO e novamente pode-se observar que os dados não eram normais, como pode ser observado no gráfico 7, a seguir. Assim, análises estatísticas não-paramétricas foram utilizadas na avaliação dos dados.

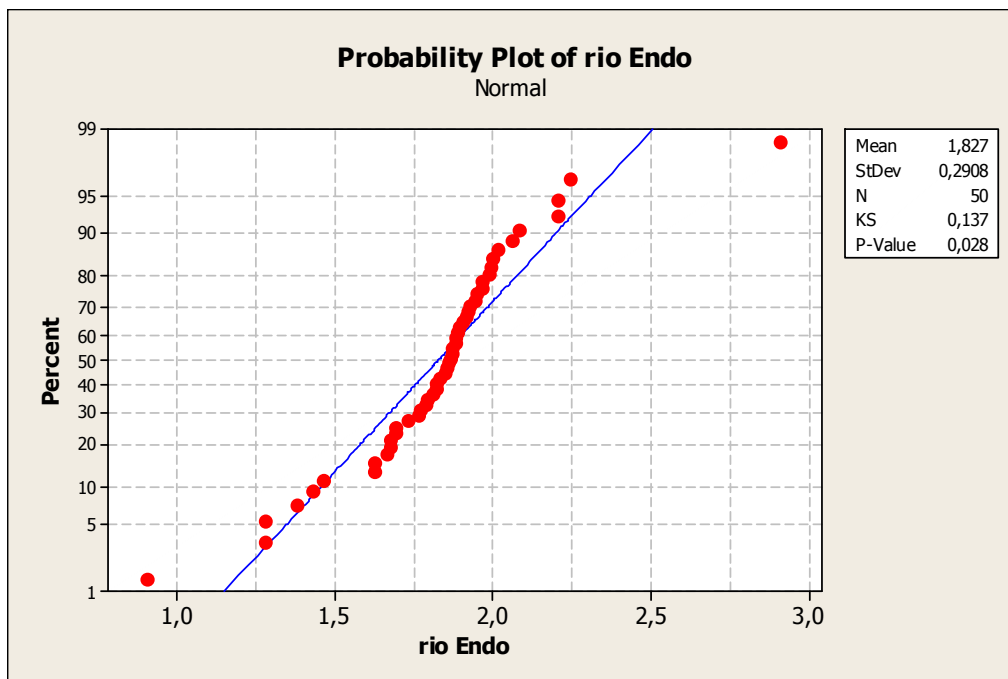
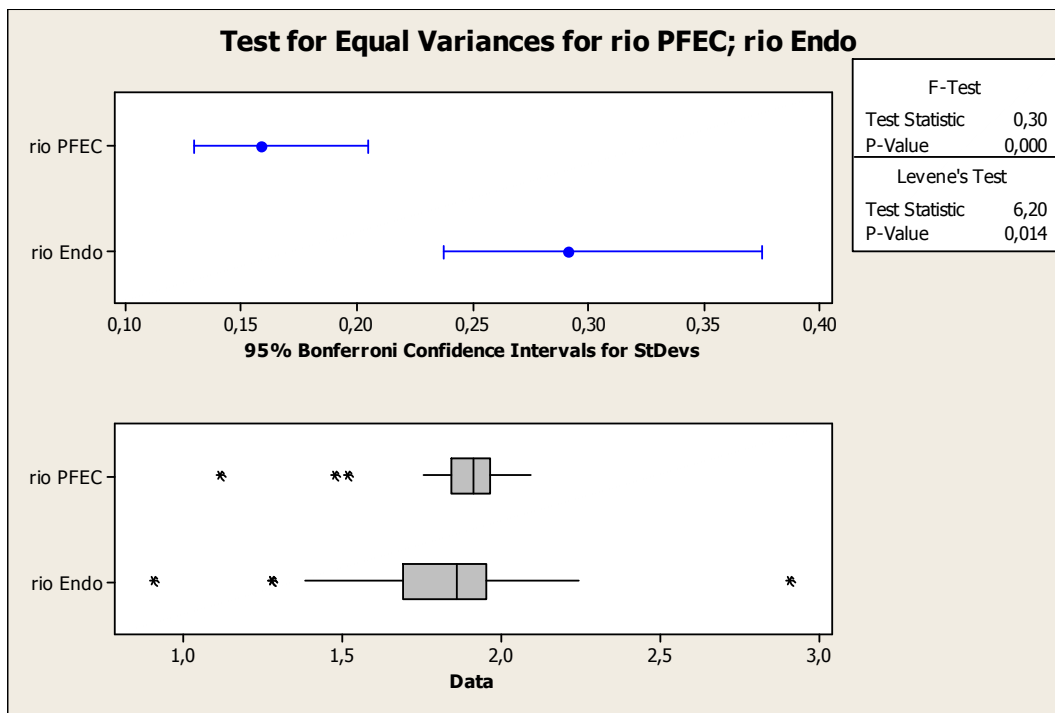


Gráfico 7: Análise da normalidade dos dados para amostras de água de consumo humano analisadas com o método M-Endo Ágar.

Foram realizados testes para verificação da variância dos resultados, comparando os resultados do método 3MTM PFEC e ENDO. Pode-se observar na parte superior do gráfico 8 que os resultados do método 3MTM PFEC apresentam um intervalo de confiança menor do que os resultados do método ENDO, o que significa que os resultados variaram menos para este método do que para o método de plaqueamento em ENDO.

Compararam-se também as medianas dos resultados, onde é possível verificar na parte inferior do gráfico 8, que as contagens no método 3MTM PFEC tiveram valores similares nas diferentes amostras, variando mais no método M-Endo Ágar.



**Gráfico 8: Teste de variâncias iguais para água de consumo humano
utilizando 3MTM PFEC x M-Endo Ágar.**

Com o teste de Bonferroni, utilizando um intervalo de confiança 95% foi possível verificar que o método 3MTM PFEC apresentou menor desvio padrão do que o método ENDO, confirmando a menor variação entre as contagens de coliformes no método 3MTM PFEC. Os resultados do teste podem ser visualizados na tabela 10.

**Tabela 10: Teste Bonferroni com 95% de intervalo de confiança para desvio
padrão.**

Método	N	Mínino	Desvio Padrão	Máximo
LOG PFEC (UFC/mL)	50	0,129101	0,158452	0,204100
LOG ENDO (UFC/mL)	50	0,236898	0,290757	0,374521

Para avaliar a correlação entre os métodos, foi realizado o Teste Levene, onde se obteve um resultado igual a 6,20 e p-valor igual a 0,014. Neste teste consideram-se correlações positivas quando o p-valor é maior do que 0,05.

Para avaliação da recuperação média dos métodos utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, já que os dados não eram normais. Este teste compara as medianas dos resultados de ambos os métodos analisados, compilados na tabela 11. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95,0% e obteve-se um resultado do teste W igual a 2786,5. Assim, o resultado não pôde ser rejeitado, pois o W é maior do que 2525,0, demonstrando a correlação entre os métodos.

A média, desvio padrão e mediana foram muito próximos para ambos os métodos, demonstrando que não houve diferença estatística para contagens de bactérias heterotróficas com o método 3MTM PFEC, quando comparado ao método ENDO, demonstrando-se que os métodos apresentam um poder de recuperação similar.

Tabela 11: dados para teste Mann-Whitney LOG 3MTM PFEC X M-ENDO ÁGAR para água de consumo humano.

Método	N	Mediana
LOG PFEC (UFC/mL)	50	1,9085
LOG ENDO (UFC/mL)	50	1,8603

6.3.4 Análise dos dados para água de poços e fontes 3MTM PFEC x M - Endo Ágar.

Os mesmos testes estatísticos descritos no item 6.3 foram utilizados para avaliar os dados analisados comparando os resultados de contagens de coliformes e *E. coli* com amostras de poços e fontes naturalmente contaminados podem ser visualizados na tabela 12, a seguir:

Tabela 12: Estatística descritiva para água de poços e fontes 3MTM PFEC x M-Endo Ágar.

Variável	N	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Mediana
LOG PFEC (UFC/mL)	40	1,7079	0,2094	12,26	1,7033
LOG ENDO (UFC/mL)	40	1,9103	0,3141	16,44	2,0334

Pôde-se verificar que houve diferenças entre as contagens nos dois métodos, considerando os resultados de Média e mediana, em logaritmos, onde existe uma tendência ao método 3MTM PFEC apresentar contagens mais baixas do que o método ENDO para amostras de poços e fontes. É interessante observar que o método 3MTM Petrifilm apresentou menor desvio padrão e menores de valores coeficiente de variação, demonstrando ser um método com melhor reprodutibilidade e precisão, mas com piorar recuperação para estas matrizes.

Observa-se no gráfico 9, que o método 3MTM PFEC ambos os métodos apresentaram grande variação nas contagens das diferentes coletas, possivelmente por serem duas diferentes matrizes, microbiota natural ou pela interferência do pH, que estava abaixo de 6,0 em algumas amostras.

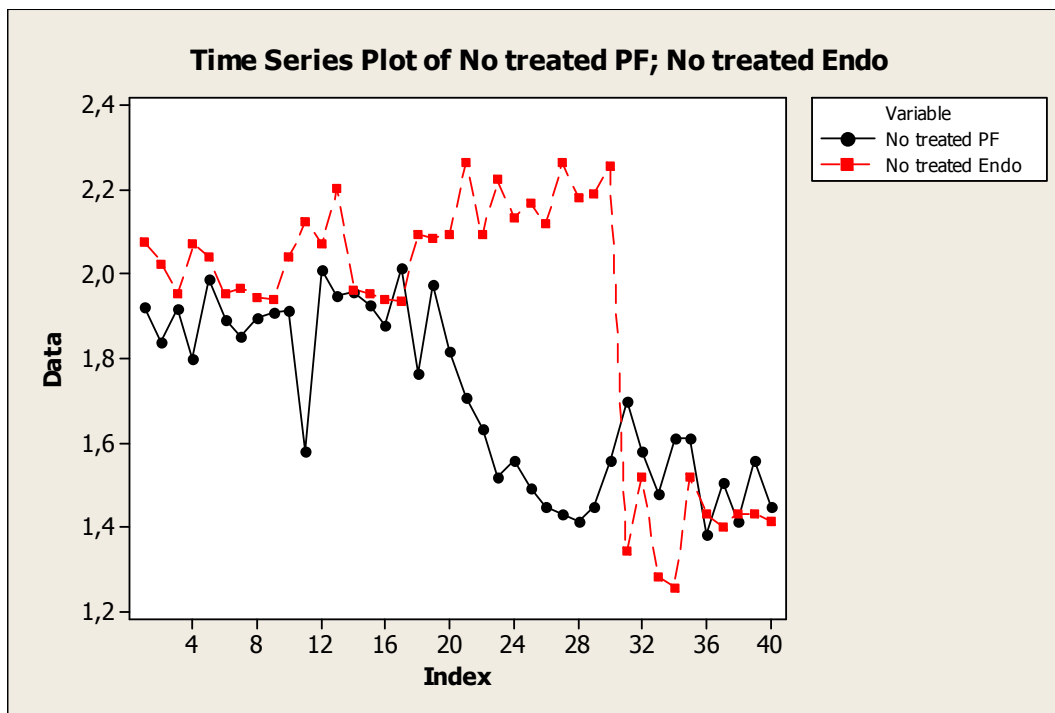


Gráfico 9: Análise conjunta da variabilidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando os métodos 3MTM PFEC x M-Endo.

Foi analisada a normalidade dos dados para amostras avaliadas com o método 3MTM PFEC e os resultados não apresentarem um sentido linear. Portanto, análises estatísticas não-paramétricas foram utilizadas na avaliação dos dados, como se verifica no gráfico 10, abaixo:

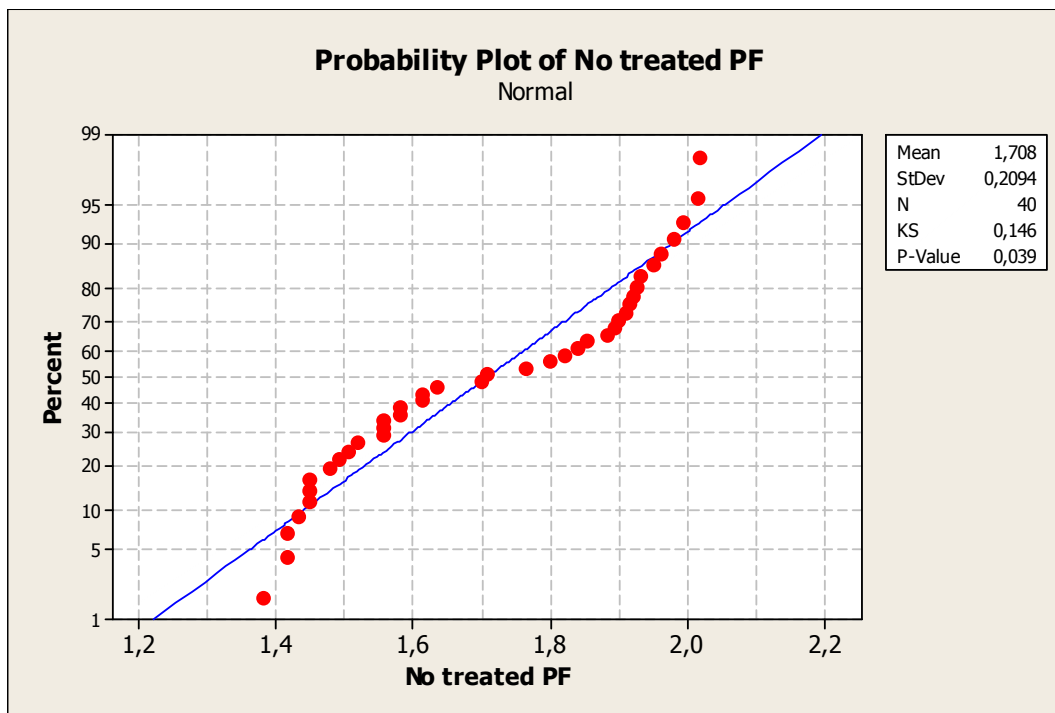


Gráfico 10: Análise conjunta da normalidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando o método 3MTM PFEC.

Testou-se também a normalidade dos dados testados com o método ENDO e estes demonstram que os resultados não são normais, por não apresentarem um sentido linear. Assim, análises estatísticas não-paramétricas foram utilizadas na avaliação dos dados, conforme elucidado pelo gráfico 11.

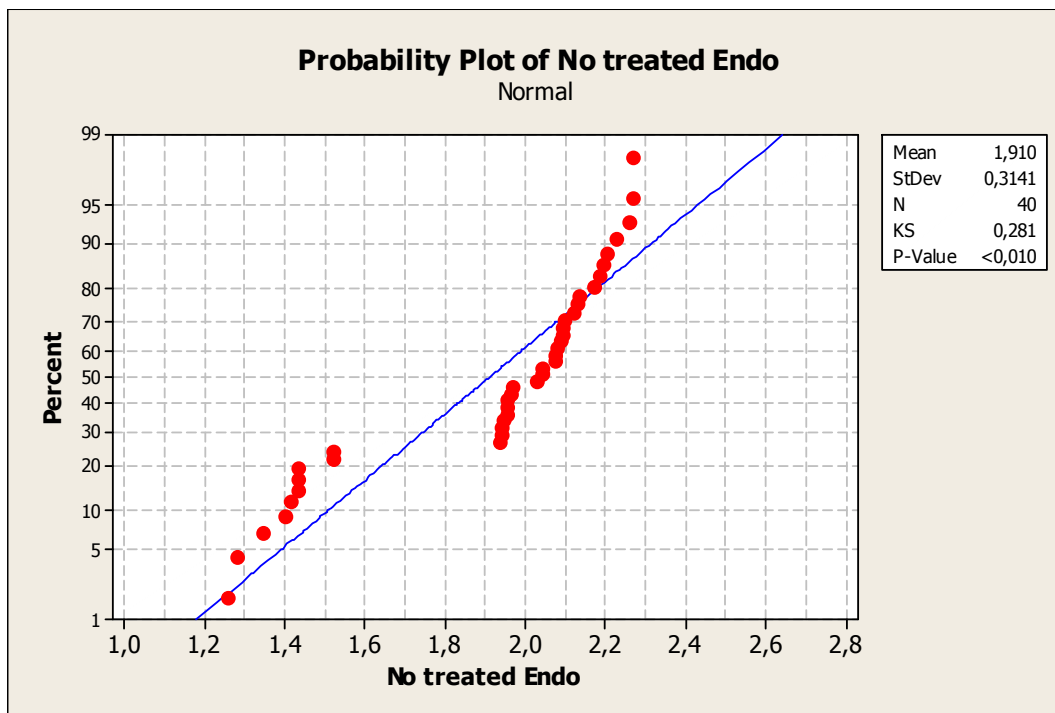


Gráfico 11: Análise de normalidade dos dados de amostras de água de poços e fontes utilizando o método M-Endo Ágar.

Foram realizados testes para verificação da variância dos resultados, comparando os resultados do método 3MTM PFEC e ENDO. Pode-se observar na parte superior do gráfico 12 que os resultados do método 3MTM PFEC apresentam um intervalo de confiança menor do que os resultados do método ENDO, o que significa que os resultados variaram menos para este método do que para o método de plaqueamento em ENDO.

Compararam-se também as medianas dos resultados, onde é possível verificar na parte inferior do gráfico 12, que as contagens no método 3MTM PFEC tiveram valores inferiores nas diferentes amostras.

Este gráfico demonstra que os resultados do método 3MTM PFEC apresentam um menor intervalo de confiança, o que significa que os resultados variaram menos para este método.

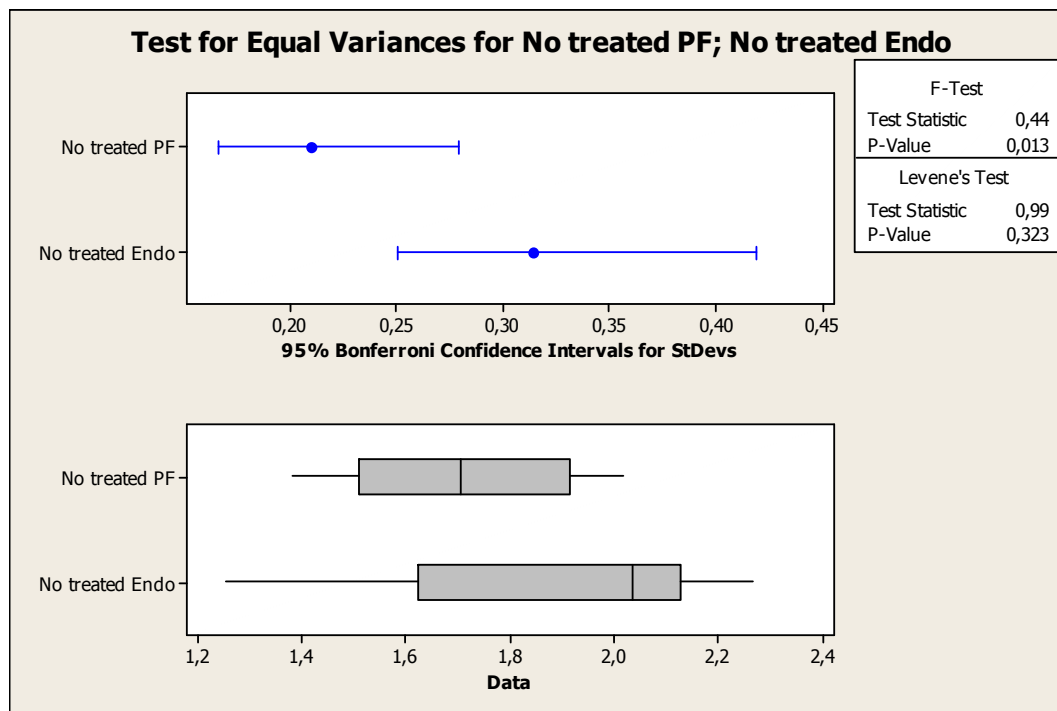


Gráfico 12: Teste de variâncias iguais para água de poços e fontes comparando as contagens em logaritmos 3MTM PFEC x M-Endo Ágar.

Com o teste de Bonferroni, utilizando um intervalo de confiança 95% foi possível verificar que o método 3MTM PFEC apresentou menor desvio padrão do que o método ENDO, confirmando a menor variação entre as contagens de coliformes no método 3MTM PFEC. Os resultados do teste podem ser visualizados na tabela 13.

Tabela 13: Teste Bonferroni, considerando 95% de intervalo de confiança para o desvio padrão.

Variáveis	N	Mínimo	Desvio Padrão	Máximo
LOG PFEC (UFC/mL)	40	0,166838	0,209357	0,279196
LOG ENDO (UFC/mL)	40	0,250285	0,314071	0,418842

Para avaliar a correlação entre os métodos, foi realizado o Teste Levene, onde se obteve um resultado igual a 0,99 e p-valor igual a 0,323. Neste teste consideram-se correlações positivas quando o p-valor é maior do que 0,05.

Para avaliação da recuperação média dos métodos utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney. Este teste compara as medianas dos resultados de ambos os métodos analisados, compilados na tabela 14. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95,0% e obteve-se um resultado do teste W igual a 1232,5. O teste não apresentou resultados, demonstrando que não houve correlação entre os métodos.

A mediana das contagens de coliformes e *E. coli* foram menores para o método 3MTM PFEC demonstrando que houve diferença estatística para amostras de águas e poços quando comparado ao método ENDO, demonstrando-se que os métodos apresentam um poder de recuperação diferente para estas matrizes, nestas condições avaliadas.

**Tabela 14: dados para teste Mann-Whitney comparando as contagens em
logaritmos dos métodos 3MTM PFEC x M-ENDO ÁGAR para água de poços e
fontes.**

Método	N	Mediana
LOG PFEC (UFC/mL)	40	1,7033
LOG ENDO (UFC/mL)	40	2,0334

7. CONCLUSÕES GERAIS:

1. Comparando os resultados das 90 análises de bactérias heterotróficas, analisando os resultados de água de abastecimento, poços e fontes, foi possível verificar que a média, desvio padrão e mediana foram muito próximos para ambos os métodos, demonstrando que não houve diferença estatística para contagens de bactérias heterotróficas com o método 3MTM Placas Petrifilm para contagem de aeróbios (AC), quando comparado ao método Plate Count Agar, e que os métodos têm o mesmo poder de recuperação. O método 3MTM Placas Petrifilm AC apresentou maior precisão.

2. Para as análises de coliformes e *E. coli* as matrizes de água foram separadas e foram avaliados 50 resultados de amostras de água de abastecimento contaminadas e estressadas, onde se observaram recuperação dos métodos muito similar, com medianas próximas, tendência de maior recuperação e maior precisão para o 3MTM Placas Petrifilm para contagem de coliformes e *E. coli* (EC) em comparação com o método M-Endo Agar (ENDO).

Para as análises de poços e fontes, naturalmente contaminadas, houve diferenças estatísticas significativas, com menor recuperação do método 3MTM Placas Petrifilm EC para contagem de coliformes e *Escheria coli* comparado ao método ENDO, porém com maior precisão para o método 3MTM Placas Petrifilm EC.

3. Não foi possível calcular a especificidade e sensibilidade dos métodos.

4. Conclui-se que os dados deste estudo demonstram uma forte correlação estatística entre o método 3MTM Placas PetrifilmTM e as metodologias convencionais para amostras de consumo humano e sugere-se que estudos adicionais, em outras regiões do país, com microbiota e características físico-químicas diferenciadas sejam

realizados, para confirmar a possibilidade do uso desta técnica como metodologia no Brasil.

A aplicação deste estudo levaria à economia de tempo de preparo de materiais, de energia elétrica, à maior padronização e precisão das análises microbiológicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21ª edição, 9000: 9-140. Washington, DC, US. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Agência Nacional de Águas (ANA). Conjuntura: recursos hídricos no Brasil Informe Nacional 2010 <http://conjuntura.ana.gov.br> - acesso em 02/02/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n.º 518/2004**. Brasília 2005.

BELOTI, V., SOUZA J. A., BARROS, M. A. F, NERO, L. A, MATTOS, M. R., GUSMÃO, V. V., MORAES, L. B. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for Total Coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 301-304. 2003.

CHAO, W. L. Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. **Letters in Applied Microbiology**. v. 42. 115-120. 2006.

CURIALE, M. S., SONS, T., MCALLISTER, J. S., HALSEY, B., FOX, T. L. Dry Rehydratable Film for Enumeration of Total Aerobic Bacteria in Foods: Collaborative

Study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 242-248. 1990.

DANIEL, L. A., BRANDÃO, C. C. S. B., GUIMARÃES, J. R., LIBÂNIO, M., DE LUCA, J. S. Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável. Tema 1, Edital 2. **Programa de Pesquisas em Saneamento Básico**, PROSAB. p. 27-43. cap. 2. 2001.

EDBERG, S.C., RICE, E.W., KARLIN, R.J., ALLEN, M.J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Society for Applied Microbiology Symposium Series**, 29, 106S-116S. 2000.

EHRENFELD, E., FRICKER, C., TOWNSEND, D. E. Medium for detection target microbes in a sample. **Patente US005610029A**. 1997.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Microbiological Alternative Test Procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, and Wastewater Monitoring Methods, **EPA - 821-B-03-004**. 2004.

FENG, P., WEAGANT S. D. **Bacteriological Analytical Manual**, cap. 4, 8^o Edição, Revisão A. 1998. www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm#authors. Acesso em 02/09/2010.

FONSECA, J. C. L., SILVA, M. R. A., BAUTITZ, I. R., NOGUEIRA, R. F. P., MARCHI, M. R. R. Avaliação da confiabilidade analítica das determinações de carbono orgânico total (COT). **Eclética Química**. V. 31. p. 47-52. 2006

GANGAR, V; CURIALE, M. S., LINDBERG, K., GAMBREL-LENARZ, S. Dry rehydratable film method for enumerating confirmed *Escherichia coli* in poultry meats, and seafood: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. v. 82, p. 73-8. 1999.

HABASH, M., JOHNS, R. Comparison study of membrane filtration direct count and an automated coliform and *Escherichia coli* detection system for on-site water quality testing. **Journal of Microbiological Methods**. v. 79. p. 128–130. 2009.

HEIJNEN, L., MEDEMA, G. Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. **Water research**. v. 43. p. 3124 – 3132. 2009.

HIRULKAR, N. B., TAMBEKAR, D.H. Suitability of the H₂S test for detection of fecal contamination in drinking water at various temperatures and incubation period. **African Journal of Biotechnology**. v 5 (10). p. 1025-1028. 2006.

HORMAN, A., HANNINENA, M. L. Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. **Water research**. v. 40. p. 3249 – 3256. 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17994 - Water Quality - Criteria for the Establishment of Equivalence Between Microbiological Methods**. Geneva, Switzerland. 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8199 - Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture**. Geneva, Switzerland. 2000.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Millennium Development Goals Report. http://mdgs.un.org/unsd/mdg/Resources/Static/Products/Progress2008/MDGReport_2008_En.pdf. 2008 - Acesso em: 16/09/2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. 2006. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html. Acesso em: 16/09/2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Statistical Information System (WHOSIS). 2009. <http://www.who.int/countries/bra/en/> - Acesso em: 17/03/2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health – Heterotrophic Plate Count Measurement in Drinking Water Safety Management.

2002. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/HPCFull.pdf. - Acesso em: 16/09/2008

REASONER, D. J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92. p. 307– 315. 2004.

ROMPRE', A., SERVAIS, P., BAUDART, J., DE-ROUBIN, M. R., LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**. v. 49. p. 31–54. 2002.

SAÚDE BRASIL. 2008. [http: www.portal.saude.gov.br / portal/ aplicacoes/ noticias/ default.cfm?pg=dsgDetalheNoticia&idárea=124&CONOTICIA=10810](http://www.portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dsgDetalheNoticia&idárea=124&CONOTICIA=10810) - Acesso em 17/03/2010.

SCHRAFT, H., WATTERWORTH, L.A.. Enumeration of heterotrophics, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M Petrifilm plates with standard plating procedures. **Journal of Microbiological Methods**. v. 60. p. 335–342. 2005.

SETTI, A. A., LIMA, J. E. F., CHAVES, A. G. M., PEREIRA, I. C. Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos. **Agência Nacional de Energia Elétrica**. p. 207. 2000.

SILVA, N., NETO, R. C., JUNQUEIRA, V. C. A, SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Água**, Núcleo de Microbiologia, ITAL, Campinas, SP. 2000.

TAMBEKAR, D.H., HIRULKAR, N.B. Rapid and modified field test for detection of faecal contamination in drinking water. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66. p. 667-669. 2007.

TAMBEKAR, D.H., JA DHAV, R.P., DHUNDALE, V. R., GULHANE, S. R., TAMBEKAR, S. D., BHOKARE, D. D. Revalidation of Testing Methods for Assessing Microbial Safety of Drinking Water. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 2. p. 129-133. 2008.

WANG, D., FIESSEL, W. Evaluation of media for simultaneous enumeration of total coliform and *Escherichia coli* in drinking water supplies by membrane filtration techniques. **Journal of Environmental Sciences**. v. 20. p. 273–277. 2008

WILDEBOER, D., AMIRAT, L., PRICE, R. G., ABUKNESHA, R. A. Rapid detection of *Escherichia coli* in water using a hand-held fluorescence detector, **Water Research**, in press. v. 44 (8). p. 2621-8. 2010.

9. ANEXOS:

9.1 Resultados microbiológicos:

Tabela 4: Dados das contagens de bactérias heterotróficas, transformados em logaritmos.

Local de Coleta	LOG (UFC/mL)	LOG (UFC/mL)
	PFAC*	PCA**
Rio Atibaia (14/08/09)	2,88	2,63
	3,07	2,43
	3,00	2,47
	3,01	2,54
	2,92	2,67
	3,02	2,54
	2,90	2,41
	2,90	2,61
	2,95	2,45
	3,00	2,58

Continuação: Tabela 4: Dados de bactérias heterotróficas, em logaritmos.

Local de Coleta	LOG PFAC*	LOG PCA**
	(UFC/mL)	(UFC/mL)
Rio Atibaia (03/09/09)	2,25	1,75
	2,27	1,65
	2,23	1,52
	2,16	1,83
	2,12	1,71
	2,09	2,06
	2,20	1,95
	2,12	2,10
	2,13	1,99
	2,17	1,95
Rio Atibaia (17/09/09)	2,25	1,95
	2,28	2,09
	2,15	2,21
	2,29	2,15
	2,35	1,79
	2,30	2,11
	2,27	2,20

Continuação: Tabela 4: Dados de bactérias heterotróficas, em logaritmos.

	2,20	2,28
	2,26	2,12
	2,25	2,23
Local de Coleta	LOG PFAC*	LOG PCA**
	(UFC/mL)	(UFC/mL)
Fonte Taquaral (30/09/09)	1,62	1,46
	1,57	1,28
	1,64	1,49
	1,65	1,71
	1,70	1,72
	1,63	1,82
	1,53	1,77
	1,62	1,69
	1,64	1,69
	1,68	1,63
Poço Luciana (04/10/09)	LOG PFAC*	LOG PCA**
	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	1,73	0,78
	1,72	0,95
	1,76	1,04

Continuação: Tabela 4: Dados de bactérias heterotróficas, em logaritmos.

	1,59	0,95
	1,83	0,60
	1,76	1,00
	1,69	0,90
	1,77	0,85
	1,83	0,70
	1,76	0,60
	1,69	2,12
	1,89	2,09
	1,91	2,18
	2,18	2,18
Água da Fonte	1,89	2,12
(07/10/09)	2,06	2,12
	1,98	2,13
	2,03	2,00
	1,83	1,95
	1,94	2,03

Continuação: Tabela 4: Dados de bactérias heterotróficas, em logaritmos.

Local de coleta	LOG PFAC*	LOG PCA**
	(UFC/mL)	(UFC/mL)
Rio Jaguari (15/11/09)	2,03	1,77
	2,01	2,18
	2,00	2,15
	2,05	2,01
	2,13	2,02
	2,02	2,10
	1,93	2,07
	2,03	2,06
	1,96	2,03
	2,01	2,03
Rio Jaguari (20/11/09)	1,69	1,81
	1,64	1,75
	1,70	1,63
	1,60	1,69
	1,51	1,70
	1,54	1,84
	1,48	1,72
	1,58	1,73
	1,63	1,70
	1,57	1,66

Continuação: Tabela 4: Dados de bactérias heterotróficas, em logaritmos.

	2,34	2,54
	2,28	2,45
	2,25	2,49
	2,32	2,39
Poço Chácara Dedé	2,26	2,44
(04/12/09)	2,27	2,36
	2,33	2,55
	2,34	2,40
	2,34	2,52
	2,31	2,39

Legenda: *PFAC – Placa Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias

**PCA – Plate Count Agar

Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3M™ PFEC e M-Endo

Ágar em logaritmos.

Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Rio Atibaia (14/08/09)	-	2,09	1,62
	-	1,97	1,73
	-	1,48	1,81
	-	1,98	1,62
	-	2,03	1,99
	-	1,99	1,46
	-	1,95	2,02
	-	2,09	1,28
	-	2,04	1,43
	-	2,06	1,77
Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Rio Atibaia (03/09/09)	0,90	1,97	1,94
	1,11	1,86	1,91
	0,70	1,76	1,28
	1,04	1,82	2,20

Continuação da Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3M™ PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos.

	1,15	1,96	1,96
	1,08	1,93	2,08
Rio Atibaia	1,15	1,91	1,66
(03/09/09)	1,04	1,95	1,96
	1,18	1,93	1,95
	1,04	1,52	2,25
	LOG PFEC* somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	Log PFEC* <i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	LOG Endo** (UFC/mL)
	1,40	1,93	1,92
	1,28	1,94	1,86
	1,41	1,90	2,06
Rio Atibaia	1,26	1,91	1,67
(17/09/09)	1,34	1,97	1,92
	1,52	1,97	2,20
	1,41	1,90	0,90
	1,45	1,79	1,88
	1,38	1,91	1,90
	1,36	1,99	1,99

Continuação da Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3M™ PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos.

Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Fonte Taquaral (30/09/09)	1,58	1,58	2,13
	1,53	2,01	2,07
	1,59	1,95	2,20
	1,63	1,96	1,96
	1,32	1,93	1,95
	1,38	1,88	1,94
	1,41	2,02	1,93
	1,52	1,76	2,10
	1,51	1,98	2,09
	1,68	1,82	2,09
Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Poço Luciana (04/10/09)	1,18	1,70	1,34
	1,23	1,58	1,52
	1,23	1,48	1,28
	1,41	1,61	1,26

Continuação da Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3MTM PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos.

	1,32	1,61	1,52
	1,04	1,38	1,43
	1,23	1,51	1,40
	1,18	1,41	1,43
	1,28	1,56	1,43
	1,23	1,45	1,41
Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Água da Fonte (07/10/09)	0,85	1,92	2,08
	1,53	1,84	2,03
	1,60	1,92	1,95
	1,53	1,80	2,07
	1,54	1,99	2,04
	1,45	1,89	1,95
	1,74	1,85	1,97
	1,38	1,90	1,94
	1,58	1,91	1,94
	1,48	1,91	2,04

Continuação da Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3MTM PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos.

Local de Coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
	1,48	1,94	1,82
	1,18	1,95	1,69
	1,32	1,94	1,85
	1,30	1,93	1,69
Rio Jaguari	1,23	1,87	1,79
(15/11/09)	1,23	1,85	1,79
	1,26	1,87	1,67
	1,38	1,86	1,38
	1,28	1,82	1,87
	1,36	1,94	1,76

Local de coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Rio Jaguari (20/11/09)	0,00	1,11	1,89
	0,85	1,85	1,87
	1,00	1,85	2,00
	0,70	1,86	1,89
	0,85	1,83	1,86
	1,04	1,81	1,91
	0,95	1,86	1,82
	1,04	1,80	1,85
	0,95	1,82	1,83
	1,08	1,77	1,88

Continuação da Tabela 07: dados das contagens de coliforme e *E. coli* para 3MTM PFEC e M-Endo Ágar em logaritmos.

Local de coleta	LOG PFEC*	Log PFEC*	LOG Endo** (UFC/mL)
	somente <i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> + coliformes (UFC/mL)	
Poço Chácara Dedé (04/12/09)	0,00	1,71	2,26
	0,70	1,63	2,09
	0,00	1,52	2,23
	0,00	1,56	2,13
	0,00	1,49	2,17
	0,00	1,45	2,12
	0,00	1,43	2,26
	0,00	1,41	2,18
	0,00	1,45	2,19
	0,30	1,56	2,26

Legenda: (-) Nas primeiras amostras não foi realizada a contagem de *E. coli* separadamente.

*PFEC – 3MTM Placa Petrifilm para contagem de coliformes e *E. coli*

**ENDO – Meio M-Endo Agar Less para contagem de coliformes totais.

9.2 Resultados dos testes de identificação bioquímica:

Tabela 08: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie	Resultados	Espécie	Resultados
	Identificada		identificada	
	Placa 1		Placa 2	
Rio Atibaia				
– 1º coleta				
			PFEC*	
1	<i>E. coli</i>	+	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. coli</i>	+	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>ni</i>	-	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-
7	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>E. coli</i>	+	<i>Serratia marcescens</i>	-
9	<i>K. oxytoca</i>	-	<i>Aeromonas hydrofila/caviae</i>	-
10	<i>ni</i>	-	<i>Aeromonas hydrofila/caviae</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie		Espécie	
	Identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Rio Atibaia				
- 1º coleta				
		ENDO**		
1	<i>Aeromonas caviae</i>	-	<i>ni</i>	-
2	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-	<i>E. coli</i>	+
3	<i>Aeromonas hydrofila</i>	-	<i>K. oxytoca/S. odorifera</i>	+
4	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	<i>Aeromonas hydrofila/caviae</i>	-
5	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	<i>E. coli</i>	+
6	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
7	<i>ni</i>	-	<i>Aeromonas hydrofila/caviae</i>	-
8	<i>E. coli</i>	+	<i>Aeromonas hydrofila/caviae</i>	-
9	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
10	<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>Klebsiela oxytoca</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie	Resultados	Espécie	Resultados
	identificada		identificada	
	Placa 1			
Rio Atibaia				
- 2º coleta		PFEC*		
1	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>K. pneumoniae/</i>	-	<i>E. coli</i>	+
	<i>E. cloacae</i>			
4	<i>E. coli/</i>	+	<i>E. coli</i>	+
	<i>Citrobacter freundii</i>			
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
7	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
8	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
9	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
10	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Espécie			Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
Placa 1			Placa 2	
Rio				
Atibaia			ENDO**	
- 2º coleta				
1	<i>K. oxytoca</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
5	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
6	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
7	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
8	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
9	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
10	<i>ni</i>	-	<i>C. freundii</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie identificada		Espécie	
	Placa 1	Resultados	identificada	Resultados
			Placa 2	
Bica				
Taquaral			PFEC*	
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Enterobacter asburiae</i>	-
2	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Enterobacter asburiae</i>	-
5	<i>Klebsiela oxytoca</i>	-	<i>K. oxytoca</i>	-
6	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
7	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	<i>E. coli</i>	+
8	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	<i>ni</i>	-
9	<i>E. sakazakii</i> / <i>E. asburiae</i>	-	<i>E. asburiae</i> / <i>S. plymutica</i> / <i>E. sakazakii</i>	-
10	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>ni</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie identificada		Espécie	
	Placa 1	Resultados	identificada	Resultados
			Placa 2	
Bica				
		ENDO**		
Taquaral				
1	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-
2	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
3	<i>Citrobacter freundii</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
5	<i>Pantoea agglomerans</i>	+	<i>ni</i>	-
6	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
7	<i>ni</i>	-	<i>Serratia</i> <i>phymuthica</i>	-
8	<i>ni</i>	-	<i>E.coli</i>	+
9	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
10	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Espécie			Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Água da	PFEC*			
Fonte				
1	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
7	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
10	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie		Espécie	
	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Água da				
Fonte			ENDO	
1	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
5	<i>C. freundii</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+
6	<i>C. freundii</i>	+	<i>E. cloacae</i>	+
7	<i>E. coli</i>	+	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	+
8	<i>C. freundii</i>	+	<i>Hafnia alvei</i>	+
10	<i>Enterobacter</i> <i>gergoviae</i>	+	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Espécie			Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Poço				
Chácara do		PFEC*		
Dedé				
1	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
5	<i>E. cloacae</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
7	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>E. cloacae</i>	-	<i>E. coli</i>	+
9	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
10	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie		Espécie	
	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Poço Chácara				
do Dedé			ENDO**	
1	<i>K. oxytoca</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	+
3	<i>A. hydrofila</i>	-	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. sakazakii</i>	+	<i>E. coli</i>	+
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	+
7	<i>E. cloacae</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>Cedeia lapagei</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	+
9	<i>E. cloacae</i>	+	<i>E. gergoviae</i>	+
10	<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>E. cloacae</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Espécie			Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Poço Chácara			PFEC*	
da Luciane				
1	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-
4	<i>E. cloacae</i>	-	<i>ni</i>	-
5	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-
6	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
7	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
8	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
9	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-
10	<i>ni</i>	-	<i>ni</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Espécie			Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Poço				
Chácara da			ENDO**	
Luciane				
	<i>K. pneumoniae/</i>			
1	<i>E. cloacae/</i>	+	<i>S. marcescens</i>	-
	<i>E. aerogenes</i>			
2	<i>ni</i>	-	<i>K. ascorbata</i>	+
3	<i>K. oxytoca</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	+
4	<i>K. oxytoca</i>	+	<i>E. cloacae/</i>	+
			<i>E. sakazakii</i>	
5	<i>K. oxytoca</i>	+	<i>E. sakazakii</i>	+
6	<i>ni</i>	-	<i>E. cloacae</i>	+
7	<i>E. gergoviae/</i>	+	<i>S. marcescens</i>	-
	<i>S. marcescens</i>			
8	<i>S. marcescens</i>	-	<i>K. oxytoca</i>	+
9	<i>S. marcescens</i>	-	<i>K. pneumoniae</i>	+
	<i>K. pneumoniae/</i>			
10	<i>E. cloacae/</i>	+	<i>E. gergoviae</i>	+
	<i>E. aerogenes</i>			

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie		Espécie	
	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Rio Jaguari				
- 1º coleta			PFEC*	
1	<i>K. oxytoca</i>	-	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	-
3	<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	-
4	<i>K. pneumoniae</i>	-	<i>K. oxytoca</i>	-
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>K. cryocrescens</i>	-	<i>E. cloacae</i> +	-
			<i>K. ascorbata</i>	
7	<i>K. oxytoca</i>	-	<i>K. kluyvera</i> +	-
			<i>K. ascorbata</i>	
8	<i>E. coli</i>	+	<i>K. cryocrescens</i>	-
			+ <i>K. oxytoca</i>	
9	<i>K. cryocrescens</i>	-	<i>K. oxytoca</i>	-
	+ <i>K. oxytoca</i>			
10	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

	Espécie		Espécie	
Colônias	identificada	Resultados	identificada	Resultados
	Placa 1		Placa 2	
Rio				
Jaguari -		ENDO**		
1º coleta				
1	<i>Aeromonas</i>	-	<i>K. oxytoca</i> +	+
	<i>hydrophila</i>		<i>E. cloacae</i>	
2	<i>E. cloacae</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+
3	<i>E. cloacae</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+
4	<i>Aeromonas</i>	-	<i>E. coli</i>	+
	<i>hydrophila</i>			
5	<i>Citrobacter freundii</i>	+	<i>K. oxytoca</i>	+
6	<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>E. aerogenes</i> + <i>K. pneumoniae</i>	+
7	<i>Citrobacter freundii</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>E. cloacae</i> + <i>E. sakazakii</i>	+	<i>E. cloacae</i>	+
9	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
10	<i>ni</i>	-	<i>K. oxytoca</i> + <i>K. pneumoniae</i>	+

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie	Resultados	Espécie	Resultados
	identificada		identificada	
	Placa 1		Placa 2	
Rio Jaguari				
- 2º coleta				
			PFEC*	
1	<i>E. cloacae</i>	-	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae/</i> <i>E. cloacae</i>	-
3	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
4	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i> + <i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	+
5	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
7	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
9	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
10	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-

Continuação da Tabela 09: Identificação das colônias de *E. coli* e coliformes pelo método Crystal BD™.

Colônias	Espécie	Resultados	Espécie	Resultados
	identificada		identificada	
	Placa 1		Placa 2	

Rio Jaguari -				
2º coleta			ENDO**	
1	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
2	<i>C. freundii</i> + <i>E. coli</i>	+	<i>E. coli</i>	+
3	<i>E. coli</i>	+	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i> +	-
4	<i>E. coli</i>	+	<i>A. hydrophila</i> <i>ni</i>	-
5	<i>E. coli</i>	+	<i>A. caviae</i> + <i>A. hydrophila</i>	-
6	<i>ni</i>	-	<i>E. coli</i>	+
7	<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>E. coli</i>	+
8	<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+
9	<i>E. coli</i>	+	<i>ni</i>	-
10	<i>Enterobacter</i> <i>asburiae</i>	+	<i>ni</i>	-

Legenda: ni – não identificado pelo kit, não foi possível confirmar estas colônias.

*PFEC – 3MTM Placa Petrifilm para contagem de coliformes e *E. coli*

**ENDO – Meio M-Endo Agar Less para contagem de coliformes totais.

- = negativo, não pertence ao grupo coliformes (para amostras avaliadas com ENDO)

ou não é *E. coli* (para amostras avaliadas com PFEC)

+ = positivo, pertence ao grupo coliformes (para amostras avaliadas com ENDO) ou é

E. coli (para amostras avaliadas com PFEC)