

ESTUDO INTRODUTÓRIO SOBRE O USO DE PETRIFILM COMO MEIO BASE PARA A UTILIZAÇÃO DE MEMBRANA FILTRANTE NA ANÁLISE DE ÁGUA

Resumo

A Estação de Tratamento de Água do Guandu é responsável pelo abastecimento da população na região metropolitana do Rio de Janeiro. Para distribuir uma água com qualidade, além de todo processo de tratamento realizado para a água captada do Rio Guandu, é realizado um monitoramento microbiológico nas diversas etapas deste processo seguindo as legislações vigentes. Um estudo com um total de 56 amostras utilizando técnica da membrana filtrante associado ao meio de cultura Petrifilm – EC para detecção de coliformes total e fecal foi realizado avaliando o grau de concordância com Colilert. O resultado encontrado foi de 94,6% (53/56) de concordância, sendo que os 5,4% (3/56) discordantes foram relacionados à ausência em três amostras de coliformes fecais, o que não invalidou a detecção de coliformes totais nestas amostras.

Palavras-chave: coliforme, membrana filtrante, controle de qualidade

Summary

The water treatment station of Guandu is responsible for supplying water to the metropolitan region of Rio de Janeiro. To supply water with a high standard of quality, besides the treatment of the water of Guandu River, microbiological monitoring is done at the several steps of this process, according to the pertaining legislation. A study was done with a total of 56 samples using the membrane filter technique associated to Petrifilm - EC culture medium for detection of total end fecal coliforms to evaluate the degree of concordance with Colilert. The result found was 94,6% (53/56) of concordance, where the 5,4% (3/56) discordance was attributed to the absence of fecal coliforms in three samples what did not invalidate the detection of total fecal coliforms in these samples.

Keywords: coliform, membrane filter, quality control

Introdução

A água é uma substância essencial para a existência dos seres vivos e, graças ao ciclo hidrológico se torna um recurso renovável. Este ciclo envolve os estados líquido, gasoso e sólido. Através da evaporação proveniente dos oceanos, mares, lagos, rios e transpiração vegetal, formam-se as nuvens que precipitam sob a forma de chuva. Parte desta, ao chegar ao solo, uma parte infiltra-se nas reservas aquíferas abastecendo-as e outra parte se destina aos oceanos e rios reiniciando um novo ciclo.

Apesar deste ciclo infinito, a água destinada ao uso humano, “água doce”, em sua maior parte está nas geleiras e encontra-se inacessível ao homem por falta de tecnologia. Desta forma, o restante de água doce se torna um recurso finito se comparado com o crescente índice populacional, das indústrias e das atividades agrícolas.

Cerca de 2/3 da superfície do Planeta Terra é constituída por água, sendo que 97,4% estão nos oceanos e mares, 2% está armazenada nas geleiras e apenas 1% está disponível

Marcos Antônio Ferreira Consoli¹,
Mario Jorge da Silva Braga¹,
Sérgio Luiz de Freitas¹,
Ana Carla Paiva da Silva¹,
Priscila da Silva Amorim¹,
Alice Aurora Batalha² * e
Simone Dornellas²

¹Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro - CEDAE

²* Autor para correspondência:
OGMA Serviços Técnicos & Consultoria
Av. César Abraão, 209
CEP: 06086-170. Osasco. SP
E-mail: info@ogmafacios.com.br

para uso, armazenadas nos lençóis subterrâneos, lagos, rios e na atmosfera (UNIAGUA, 2001).

A Companhia Estadual de Água e Esgoto (CEDAE) é responsável pelo tratamento da água bruta do Rio Guandu, formado pelos Rios Santana, Ribeirão das Lajes e Rio Paraíba do Sul, sendo este último, o doador de 80% do abastecimento de água da cidade do Rio de Janeiro e Baixada Fluminense. Este rio passa pelos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro em um percurso de cerca de 1.100 quilômetros, recebendo os efluentes domésticos e industriais provenientes destes estados.

Segundo a Resolução nº 357/05 do CONAMA³, o Sistema Guandu pertence à Classe 2, pois seus corpos hídricos são destinados ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional. Já a Portaria 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde que revogou a Portaria 1469 de 2000, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

Buscando sempre manter a qualidade de água distribuída à população do Grande Rio, a CEDAE iniciou a avaliação de um meio de cultura (Petrifilm – 3M[®]) associado à técnica da Membrana Filtrante (MF) que, permitindo enumerar, distinguir e confirmar a presença de colônias de coliformes total e fecal e bactérias gram-negativas não pertencentes ao grupo de coliformes, agilizará os procedimentos microbiológicos.

Desenvolvimento

Como a água do Sistema Guandu antes de ser captada já passou pelos estados de Minas Gerais e São Paulo até chegar ao estado do Rio de Janeiro, esta água já foi captada, utilizada e lançada como efluente pelas residências e indústrias destes estados até o Rio Guandu. Para o seu tratamento a CEDAE construiu, em 1955, uma Estação de Tratamento de Água (ETA) no Km 19,5 dentro do município de Nova Iguaçu, captando 42 mil litros de água por segundo.

A estrutura de uma ETA é composta de maneira simplificada pela captação da água superficial que irá passar por etapas para o seu tratamento até a rede de distribuição (Figura 1). Após a captação da água bruta, adiciona-se cal, coagulante e sulfato de alumínio em um tanque de mistura, e esta é encaminhada à etapa do floculador, onde a água se movimenta para que as substâncias químicas adicionadas anteriormente aglutinem as impurezas formando flocos grandes de fácil remoção. A seguir esta água passa pelo decantador que tem a função de sedimentar os flocos formados anteriormente no fundo do tanque. Como nesta etapa ainda existem flocos leves e outras impurezas, a próxima etapa é a filtração, na qual a água passa por várias camadas formadas por areia, carvão e cascalho retendo o restante das impurezas dando o aspecto límpido à água.

Mesmo com este aspecto a água ainda não está liberada para o consumo, sendo necessário acrescentar o cloro para eliminar

microrganismos patogênicos, um composto de flúor para diminuir a incidência de cárie e cal para correção do pH.

Os microrganismos patogênicos são representados pelo grupo de coliforme total e fecal que quando presentes indicam que a água distribuída é um risco para a saúde humana.

O grupo de coliformes totais é definido segundo a Portaria nº 518 no Art. 4º das definições, no item VI como “bactérias gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadores de esporos, oxidase-negativas, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35,0 ± 0,5°C em 24 a 48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β-galactosidase”.

Para o grupo de coliformes termotolerantes (fecais) no mesmo artigo no item VIII – “*Escherichia coli* – bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a 44,5 ± 0,2°C em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas β-galactosidase e β-glucuronidase, sendo considerada o mais específico indicador de constaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos”.

No Art. 11, a nota § 7º assinala que “Em 20% das amostras mensais para análises de coliformes totais nos sistemas de distribuição, deve ser efetuada a contagem de bactérias heterotróficas e, uma vez excedidas 500 unidades formadoras de colônias (UFC) por ml, devem ser providenciadas imediata coleta, inspeção local e, se constatada irregularidade, outras providências cabíveis”. Isto demonstra a importância da contagem de bactérias viáveis não pertencentes ao grupo de coliforme que podem trazer uma informação valiosa sobre a qualidade de água e do sistema de tratamento.

Através das pesquisas destes microrganismos e de testes físico-químicos de acordo com as legislações vigentes realizados nas diversas etapas de produção da água, esta poderá ser distribuída de maneira segura para a população.

Material e Método

Amostras de água

As amostras de água foram provenientes de quatro etapas da ETA, água bruta do Rio Guandu, água decantada, água filtrada da estação nova de tratamento (NETA) e por último a água tratada Lameirão que é destinada para rede de distribuição.

Foram coletados 200 ml das amostras de água em recipientes estéreis, sendo que o frasco para a coleta da água tratada do Lameirão continha N/40 tiossulfato de sódio solução para neutralizar o cloro presente, evitando assim, a liberação de resultado falso negativo.

No estudo proposto, as 56 amostras totais foram divididas em dois grupos devido ao fator de diluição utilizado para as águas brutas e decantadas. O grupo A foi testado em

quatro dias alternados com a diluição 1/1000 e 1/100 para as coletas das águas bruta e decantada respectivamente, totalizando 32 amostras. O grupo B foi testado em três dias alternados com a diluição 1/100 e 1/10 para as águas bruta e decantada respectivamente, totalizando 24 amostras. As amostras provenientes da água filtrada NETA e Lameirão foram analisadas sem utilização de fator de diluição.

Técnica da membrana filtrante - MF

A técnica da membrana filtrante permite a contagem de todas as bactérias presentes em volumes de 100 ml de água. A amostra é filtrada em uma membrana Millipore filtro HAWG poro 0,45 µm retendo os microrganismos existentes neste volume de água e a seguir é transferida para a superfície do meio de cultura Petrifilm – EC previamente hidratado. O resultado de crescimento bacteriano após o período de incubação específico é expresso em unidade formadora de colônia (UFC) em 100ml, considerando-se os possíveis fatores de diluições utilizados.

Petrifilm – EC associado à técnica MF

O meio de cultura Petrifilm – EC é composto por nutriente VRB (Violet Red Bile), ágar solúvel em água fria, o indicador

cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) e um substrato cromogênico para β-glucuronidase. Estes dois componentes facilitam a contagem e a distinção de coliformes totais e *E. coli*.

O primeiro procedimento para utilizar o Petrifilm – EC consiste em hidratar o meio de cultura com 1 ml de água estéril, em seguida levá-lo ao refrigerador à temperatura de 2 a 8°C por 1 hora. Após gelificação do meio de cultura, o filme superior é levantado para colocação da membrana com 100 ml da amostra filtrada e delicadamente o filme superior é abaixado cobrindo a membrana e impedindo a formação de bolhas.

Para cada grupo de meio de cultura Petrifilm – EC hidratado um controle negativo foi realizado, certificando assim a não existência de resultados falsos positivos.

A incubação do Petrifilm – EC é realizada por 24 a 48 horas a 35°C ± 1°C, segundo método da AOAC Official Methods (Figura 1). A contagem e identificação de colônias para coliforme total é evidenciada pela presença de colônias vermelhas e azuis com a formação de bolhas de gás. Para coliforme fecal (*Escherichia coli*) é evidenciada pela presença de colônias azuis com a formação de bolhas de gás.

A formação de colônias vermelhas é devido à presença do indicador cloreto de trifeniltetrazolio (TTC), e a formação de bolhas se dá pelo aprisionamento do gás pelo filme superior do Petrifilm produzido pelo grupo de coliforme total (Figura 2). A presença de colônias azuis com bolhas de

Grupo	Test Colilert		Petrifilm - EC		Test Colilert		Petrifilm - EC		Test Colilert		Petrifilm - EC		Test Colilert		Petrifilm - EC	
	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC	NMP	UFC
A	Data: 29/11/05 Inc: 24 h		Data: 30/11/05 Inc: 24 a 48 h		Data: 05/12/05 Inc: 24 h		Data: 07/12/05 Inc: 24 h		Data: 05/12/05 Inc: 24 a 48 h		Data: 07/12/05 Inc: 24 h		Data: 05/12/05 Inc: 24 a 48 h		Data: 07/12/05 Inc: 24 a 48 h	
Tipo de água	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
BRUTA Dil. 1000	9500	1000	20000	1000	3100	0	8000	0	16400	1990	20000	1600	101700	7400	34000	12000
LAMEIRÃO Sem diluição	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Decantada Neta Dil. 100	5730	1090	600	500	1210	200	1000	0	1870	168	100	0	3500	520	600	200
Filtrada Neta Esquerda sem diluição	73,3	2	3	2	19,9	3,1	5	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Controle Negativo	—	—	OK	OK	—	—	OK	OK	—	—	OK	OK	—	—	OK	OK

Tabela 1. Correlação das amostras do grupo A

CT = Coliforme Total; CF= Coliforme Fecal; NMP = Número Mais Provável; UFC = Unidade Formadora de Colônia; Inc = Tempo de incubação

Grupo	Test Colilert		Petrifilm - EC		Test Colilert		Petrifilm - EC		Test Colilert		Petrifilm - EC	
	NMP		UFC		NMP		UFC		NMP		UFC	
B	Data: 14/12/05		Inc: 24 a 48 h		Data: 15/12/05		Inc: 24 a 48 h		Data: 04/01/06		Inc: 24 a 48 h	
	Inc: 24 h		Inc: 24 a 48 h		Inc: 24 h		Inc: 24 a 48 h		Inc: 24 h		Inc: 24 a 48 h	
Tipo de água	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
BRUTA Dil. 100	13540	740	10000	2000	10460	1480	2600	1700	9060	1070	3900	1500
LAMEIRÃO sem diluição	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Decantada Neta Dil. 10	1670	74	180	30	546	134	160	30	2920	970	260	70
Filtrada Neta Esquerda sem diluição	166	6	34	0	45,7	3	26	2	NEG	NEG	NEG	NEG
Controle Negativo	—	—	OK	OK	—	—	OK	OK	—	—	OK	OK

Tabela 2. Correlação das amostras do grupo B

gás é indicada como *E. coli*, pois a enzima β -glucuronidase hidrolisa o substrato cromogênico do meio produzindo a cor azul.

O resultado é liberado em Unidade Formadora de Colônia – UFC em 100ml, considerando as possíveis correções pelo fator de diluição utilizado.

Colilert Quanti-Tray (IDEXX)

Trata-se de um método usado para detecção e contagem de coliformes totais e *E. coli* em água. Quando os coliformes totais metabolizam o nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), a amostra apresenta a coloração amarela. A *E. coli*

metaboliza a ONPG e o 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG) apresenta fluorescência azul sob luz UV.

Para cada amostra de 100ml de água é adicionada a mistura contendo os nutrientes indicadores (ONPG e MUG). Após homogeneização, a amostra é despejada na bandeja (Quanti-Tray) que possui 97 poços e é levada a seladora para ser lacrada a bandeja.

O Colilert é incubado por 24 horas a $35,0 \pm 1^\circ\text{C}$. O resultado segue uma tabela de interpretação presente na bula do kit, que deve usar um comparador para distinguir a coloração amarela, ou seja, o poço com um amarelo menos intenso que o comparador é interpretado com negativo para coliforme total e *E. coli*. Para poços com coloração de amarelo igual ou mais intenso que o comparador é interpretado como positivo para coliforme total e poços apresentando a cor amarela com fluorescência igual ou mais intensa que o comparador como positivo para *E. coli*.

A contagem de coliformes totais e *E. coli* presentes na amostra de água testada segue a tabela de número mais provável (MPN), liberando um resultado estimado para 100ml.



Figura 2. Petrifilm – EC: à esq. – Controle Negativo; à dir. – Positivo para *E. coli* e coliforme total

Resultado

Foram comparados os meios de cultura Petrifilm-EC com o Colilert Quanti-Tray em quatro tipos de água oriundas de etapas da ETA totalizando 56 amostras. Nesta avaliação foi

verificada a correlação qualitativa entre os dois métodos, ou seja, se a mesma amostra testada nos diferentes kits estabelecia correspondência em detectar a presença de coliformes total e fecal.

A correlação foi avaliada através de um indicador que, quanto mais próximo de 1 (um) expressa, mais precisão e confiabilidade no teste, demonstrando que existe correspondência entre os métodos utilizados. O indicador foi obtido pela divisão do número de correlações concordantes pelo número total de amostras testadas.

A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos para o grupo A, na qual das 32 amostras testadas, 30 obtiveram o índice de concordância de 0,94 e apenas duas amostras da água decantada referentes aos dias 30/11/05 e 05/12/05 apresentaram resultados discordantes para coliforme fecal (CF).

A Tabela 2 apresenta os dados das 24 amostras pertencentes ao grupo B.

Dentro deste grupo, 23 amostras foram concordantes, fornecendo um índice igual a 0,96 e apenas uma amostra da água filtrada do dia 14/12/05 foi discordante para coliforme fecal.

As amostras de água oriundas da Filtrada Neta esquerda que não positivaram com ambos os métodos, nem para coliforme total (CT) e nem para coliforme fecal (CF), apresentaram essa característica devido à coleta correspondente a saída da água filtrada neta direita ter sido clorada.

Dos sete controles negativos somente realizados para o meio de cultura Petrifilm – EC todos apresentaram o resultado esperado. O grau de concordância geral entre os métodos considerando-se as 56 amostras testadas, foi

de 94,6% (53/56), observando-se um grau de discordância de 5,4% (3/56), em todos os casos com problemas na detecção de *E. coli* pelo Petrifilm

Conclusão

De acordo com as definições das legislações para coliformes total e fecal encontrados na água, observa-se que o meio de cultura Petrifilm – EC utilizado como base para técnica da membrana filtrante atende aos requisitos para detecção destes microrganismos, uma vez que permite comprovar a fermentação da lactose, a formação de gás e hidrólise da β -glucuronidase na existência de *E. coli*.

As diferentes diluições seriadas efetuadas para o Grupo A e Grupo B das amostras foram realizadas no intuito de diminuir outros grupos de bactérias gram-negativas que poderiam por competição, inibir o crescimento do grupo de coliformes fecais.

As duas amostras do Grupo A e uma amostra do Grupo B que não detectaram a presença de *E. coli* devem ser mais investigadas em relação ao índice de bactérias heterotróficas presente nestas amostras. Isto não invalidou o teste de análise microbiológica para água porque estas mesmas amostras com o mesmo meio de cultura Petrifilm-EC detectaram a presença de coliformes totais. Este resultado já é suficiente para indicar a não potabilidade da água.

Os resultados deste estudo demonstram que o meio de cultura Petrifilm-EC parece ser promissor para o seu uso na rotina microbiológica de água. Testes com maior número de amostras e com níveis altos de bactérias heterotróficas podem ser de grande ajuda para adequação deste meio de cultura nesta rotina.

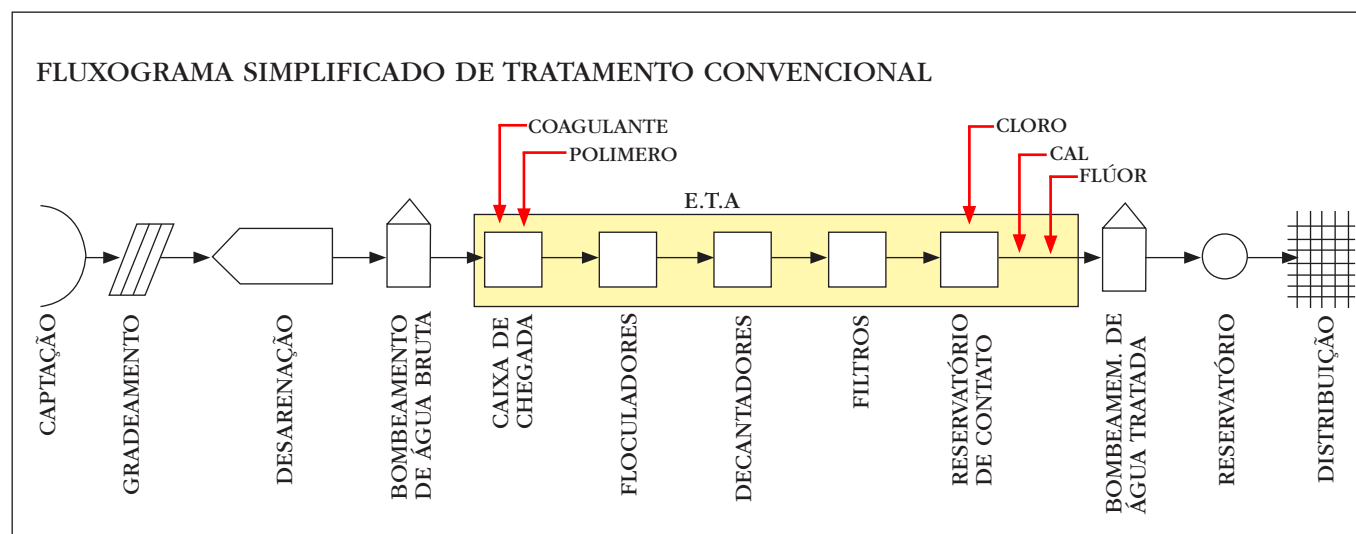


Figura 1. Esquema simplificado da ETA

Referências

1. ALLIANCE. *Água e Energia: aproveitando as oportunidades de eficiência de água e energia não exploradas nos sistemas de água municipais*. Aliança para a conservação de energia. Washington, DC, 2002.
2. American Public Health Association. 1998. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 20th Ed. APHA. Washington, DC.
3. AOAC, 2000a. Method 991.14.p.22-23. **In Official methods of analysis fo AOAC International**. 17 th ed. AOAC, Gaithersburg, MD.
4. AOAC, 2000b. Method 998.08.p.39-40. **In Official methods of analysis fo AOAC International**. 17 th ed. AOAC, Gaithersburg, MD.
5. BRASIL, Ministério do Meio Ambiente – CONAMA, Resolução nº 357. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília, 2005.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 518. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**. Brasília, 2004.
7. CVS (Centro de Vigilância Sanitária) <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/rotagua.html> Acesso em: 08 novembro 2004
8. MURRAY, PR; BARON, EJ; et al. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM PRESS. Washington, D.C., 6ed, 1995.
9. ONU (Organização das Nações Unidas), *Água Doce 2003*. Disponível em: <http://www.wateryear2003.org>. Acesso em: 08 de novembro 2004.
10. RIBEIRO, MM; SILVA, AM; et al. *Avaliação da qualidade da água do Rio Guandu e seus afluentes*. Disponível em: <http://www.profrios.hpg.ig.com.br/html/artigos/artigos.htm>. Acesso em: 08 de novembro 2004
11. UNIAGUA (Universidade da água), *Água no Planeta*. Disponível em: <http://www.uniagua.org.br/aguaplaneta.htm>. Acesso em: 08 de novembro 2004.
12. VAIL, JH; MORGAN, R; et al. *Enumeration of Waterborne Escherichia coli with Petrifilm Plates: Comparison to Standard Methods*. **J. Environ. Qual.** 32:368-373, 2003.