

I-168 - INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM ÁGUA TRATADA E DISTRIBUÍDA PARA CONSUMO HUMANO: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PRESENÇA/AUSÊNCIA

Camila Abreu Borges da Silva

Bióloga (UFV), Mestranda em Engenharia Ambiental (UFES).

Rafael Kopshitz Xavier Bastos⁽¹⁾

Engenheiro Civil (UFJF), Especialização em Engenharia de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ), PhD em Engenharia Sanitária (University of Leeds), Professor Associado, Departamento de Engenharia Civil (UFV)

Renata Cristina Chagas

Engenheira Ambiental e Mestre em Engenharia Agrícola (UFV), Doutoranda em Engenharia Ambiental (UFES).

Carolina Ventura da Silva

Nutricionista (UFV), Mestre e Doutoranda em Engenharia Ambiental (UFMG).

Rosane Cristina Andrade

Engenheira Ambiental, Mestre e Doutoranda em Engenharia Civil (UFV).

Endereço⁽¹⁾: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Civil. Viçosa-MG. 36570-000. (Tel) 31 3891 3753. E.mail:rkxb@ufv.br

RESUMO

São apresentados os resultados da análise de presença/ausência de coliformes totais e de *E.coli* em amostras de água tratada de duas redes de distribuição em Viçosa-MG. O estudo envolveu a avaliação comparativa do emprego de dois meios cromogênicos/fluorogênicos (Colilert® e ReadyCult®) e da técnica da fermentação da lactose complementada pelo teste do indol. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas apenas entre os resultados de detecção de coliformes totais com a técnica da fermentação da lactose e Colilert®. Os dois meios cromogênicos mostraram-se equivalentes na detecção de coliformes totais, bem como ReadyCult® e a técnica da fermentação. Na detecção de *E.coli*, as três técnicas testadas forneceram resultados estatisticamente semelhantes.

PALAVRAS-CHAVE: Água para consumo humano, coliformes totais, *E.coli*, métodos de detecção.

INTRODUÇÃO

A pesquisa rotineira de organismos patogênicos em amostras ambientais é cara, trabalhosa e pode esbarrar em limitações analíticas. Por essas razões, em geral, na avaliação da qualidade microbiológica da água recorre-se ao emprego de organismos indicadores de contaminação, particularmente às bactérias do grupo coliforme. Nesse sentido, a norma brasileira de qualidade da água para consumo humano estabelece os seguintes critérios para avaliação da potabilidade da água em sistemas de distribuição: ausência de coliformes totais (CT) em 95% de amostras analisadas mensalmente, e ausência de *Escherichia coli* (BRASIL, 2004)

Coliformes totais (ou bactérias do grupo coliforme) são definidos como bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em 24-48 horas, e que apresentam atividade da enzima β -galactosidase (BRASIL, 2004). São bactérias habitantes do trato intestinal de seres humanos e animais homeotérmicos, mas vários gêneros e espécies desse grupo se apresentam também como organismos de vida livre e por isso não são indicadores inequívocos de contaminação da água; em sistemas de distribuição de água tratada atuam mais como indicadores de integridade do sistema (BASTOS et al., 2001). A *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo coliforme que fermenta lactose e manitol com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, é oxidase negativa, não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas β -galactosidase e β -glicoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal e da eventual presença de organismos patogênicos (BRASIL, 2004).

O alcance e as limitações do emprego dos organismos indicadores estão associados, dentre outros motivos, à sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção e enumeração desses organismos, ou seja, à capacidade de minimizar problemas de resultados falso-positivos e falso-negativos. Na tentativa de superar tais dificuldades, a indústria da Microbiologia Sanitária e Ambiental é pródiga no lançamento de novos produtos e meios de cultura. Entretanto, como toda e qualquer metodologia analítica ou novo produto, a aceitação definitiva requer validação em bases científicas.

Para a detecção de bactérias do grupo coliforme, as técnicas por muito tempo mais comumente utilizadas eram aquelas baseadas, essencialmente, na capacidade dessas bactérias de fermentação da lactose e, no caso específico da *E. coli*, em sua capacidade adicional de produção de indol a partir do triptofano. No entanto, essas técnicas enfrentam limitações importantes, pelo reconhecimento atual de que várias cepas de coliformes são lactose-negativas e de que algumas cepas de *E. coli* são também lactose-negativas ou indol-negativas (WRF, DWI, 2010). Ou seja, esses métodos estão sujeitos a resultados falso-negativos.

Mais recentemente, surgiram os métodos cromogênicos/fluorogênicos, também conhecidos como testes do substrato definido ou substrato enzimático, os quais utilizam meios de cultura que contêm substratos que são clivados pelas enzimas β -D-galactosidase e β -D-glicoronidase, liberando o cromógeno ou o fluorógeno utilizados na detecção, respectivamente, de coliformes totais e *E. coli*. Muito embora, os métodos cromogênicos/fluorogênicos não estejam isentos de resultados falso-negativos ou falso-positivos (por exemplo, há indícios que bactérias sob estresse ambiental apresentem dificuldade de metabolizar o substrato definido, e que outras bactérias apresentem atividade enzimática β -D-galactosidase e β -D-glicoronidase), tem prevalecido o entendimento de que esses métodos apresentam sensibilidade e especificidade mais elevadas do que as técnicas tradicionais de detecção/quantificação de coliformes e *E. coli* (WRF, DWI, 2010). Os métodos cromogênicos/fluorogênicos apresentam ainda outras vantagens, tais como: dispensam o emprego de temperatura elevada ($44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$), fornecem leitura simultânea em 24 horas para coliformes totais e *E. coli* e, em geral, dispensam testes confirmativos; por sua vez as técnicas tradicionais requerem duas temperaturas de incubação ($35 \pm 0,2^\circ\text{C}$ para coliformes totais e $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ para *E. coli*) e vários testes confirmativos, o que pode estender as análises a 72 horas (WRF, DWI, 2010).

Várias marcas comerciais de meios de cultura cromogênicos/fluorogênicos encontram-se disponíveis no mercado, com aplicação em técnicas quantitativas (membrana filtrante e número mais provável, com contagens em cartelas e pela técnica dos tubos múltiplos) ou qualitativas (Presença/Ausência - P/A). Dentre as marcas que contam com aprovação das instituições *US Environmental Protection Agency* (USEPA) dos EUA e *Drinking Water Inspectorate* (DWI) do Reino Unido, encontram-se: m-ColiBlue[®] 24, Readycult[®], Chromocult[®], Coliscan, E*colite[®], Colitag[®], MI Agar, Colilert[®], Colilert-18[®] e Colisure[®]. Essencialmente, a diferenciação desses meios se dá em termos do cromógeno e, ou do fluorógeno presentes, além das substâncias utilizadas para inibição do crescimento de competidores (WRF, DWI, 2010).

No *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), o método do substrato enzimático é recomendado para amostras de água bruta e tratada; são citados os substratos cromogênicos orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosidase (ONPG) e cromofenol-vermelho- β -D-galactopiranosidase (CPRG), hidrolisáveis pela enzima β -D-galactosidase, típica das bactérias do grupo coliforme. Para a detecção de *E. coli*, a citação recai sobre o substrato fluorogênico 4-metil-umberliferil- β -D-glicoronidase (MUG), hidrolisável pela enzima *E. coli*-específica β -glicoronidase. A formulação comercial Colilert[®], contendo ONPG e MUG (USEPA, 1992) já se encontra largamente testada em amostras de água tratada e de fontes de abastecimento superficiais e subterrâneas e conta com grande penetração de mercado internacional, inclusive no Brasil. Outra formulação comercial com aceitação de mercado crescente para testes P/A é o Readycult[®], que apresenta em sua composição o substrato fluorogênico MUG para a detecção de *E. coli*, porém outro substrato cromogênico para a detecção de coliformes: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosidase (X-GAL); do mesmo fabricante e idêntico em composição ao Readycult[®], mas utilizado para testes quantitativos em técnicas de tubos múltiplos, existe no mercado o Fluorocult[®] LMX (USEPA, 2002).

A literatura internacional registra vários trabalhos de comparação entre métodos baseados na fermentação da lactose e métodos cromogênicos para detecção ou enumeração de coliformes e *E. coli* em amostras de água, bruta e tratada, como, por exemplo: na Suécia (ECKNER, 1998), nos EUA (HAMILTON et al., 2005), na Itália (BONADONNA et al., 2007) e um estudo em 13 países na Europa (NIEMELA et al., 2008). A maioria dos estudos publicados diz respeito ao meio Colilert[®], mas cabe o registro de dois trabalhos envolvendo vários

dos meios citados de uso autorizado nos EUA e no Reino Unido (OLSTADT, 2007; WRF, DWI, 2010). Em relação ao Readycult® e ao Fluorocult®, Manafi e Rosmann (1996) compararam a detecção (P/A) de CT e *E.coli* em amostras de água bruta e tratada na Áustria, utilizando Readycult® e métodos tradicionais padronizados pela EPA (EUA) e pela *Industry Standards & Regulations* da Alemanha. Na Inglaterra, Fricker e Fricker (1996) compararam o uso de Fluorocult® LMX e Colilert® também em testes qualitativos (P/A) de CT e *E.coli* em amostras de água bruta e tratada. Nikaeen et al. (2009) testaram o uso de Fluorocult® LMX em amostras de água tratada no Iran, comparativamente a métodos tradicionais de fermentação (tubos múltiplos e P/A) definidos no *Standard Methods*.

No Brasil, embora mais escassos, há também registros de estudos comparativos sobre o emprego de métodos cromogênicos e os chamados tradicionais, mas principalmente em estudos com amostras de águas *in natura* e águas residuárias. Braz et al. (2001), compararam o emprego de Colilert® Quanti-Tray e de técnicas da fermentação em tubos múltiplos –TFTM (caldo lactosado ou meio A1, caldo lactose verde brilhante e meio EC), na quantificação de CT, coliformes termotolerantes (CTer) ou *E.coli* em praias de água doce em Belém-PA. Cerqueira et al. (2001) compararam as contagens de CTer e *E.coli* em amostras de esgoto bruto e efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETES) em Belo Horizonte, utilizando a técnica da membrana filtrante (m-FC, $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e Colilert® Quanti-Tray. Em Natal-RN, Lima et al. (2001) realizaram estudo comparativo entre técnicas de quantificação de CTer ou *E.coli* em amostras de água superficial e de águas residuárias utilizando as mesmas técnicas e meios que Cerqueira. Chernicharo et al. (2001) utilizaram a técnica de tubos múltiplos e Colilert® em amostras de esgoto bruto e de efluentes anaeróbios. Bettega et al (2005) analisaram amostras de água bruta, tratada e distribuída em Curitiba-PR e compararam as contagens de CT, CTer ou *E.coli* empregando a TFTM (caldo lauril sulfato de sódio e caldo EC) e um ‘kit’ cromogênico com meio de cultura contendo X-Gal e MUG. Em Campinas-SP, Cantusio Neto (2001) comparou a detecção (quantitativa e qualitativa) de CT, CTer ou *E.coli* em amostras de água tratada utilizando a TFTM e Colilert®. Greggi (2005), em Araquara-SP, verificou a eficiência comparativa do emprego de Colilert®, Readycult® e da TFTM (caldo Lauril Sulfato Triptose, Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante e caldo EC) na análise de amostras de água de diversas origens (rios, córregos, riachos, represas, lagos, poços, nascentes e sistemas de abastecimento público) para a determinação de CTR, CTer ou *E.coli*.

Como destacado em WRF, DWI (2010), o emprego de técnicas de determinação de coliformes em amostras de água será, sempre, objeto de validação em contextos locais. O *Standard Methods* recomenda que laboratórios que pretendam utilizar o teste do substrato enzimático devem realizar estudos comparativos entre essa técnica e um dos métodos padronizados para a detecção de coliformes (APHA, 1998). Assim, o presente trabalho objetiva contribuir com informações sobre o emprego de algumas dessas técnicas sob o seguinte contexto: avaliação comparativa do uso de Colilert®, Readycult® e da técnica da fermentação na identificação (P/A) de CT e *Escherichia coli* em amostras tomadas em redes de distribuição de água tratada para consumo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

A comparação das técnicas de detecção de CT e *E.coli* (presença/ausência) foi realizada por meio da análise de amostras de água tratada coletadas em duas redes de distribuição em Viçosa-MG, ao longo de 12 meses. Na rede de distribuição 1 foram selecionados nove pontos de amostragem, tendo sido analisadas 108 amostras. Na rede 2 foram analisadas 90 amostras, coletadas em 18 pontos de amostragem.

Apresenta-se a seguir uma descrição sucinta dos meios de cultura/técnicas utilizadas:

- Ensaio completo da técnica da fermentação (TF) para determinação de coliformes conforme descrito no *Standard Methods* (APHA, 2005) e detecção rápida de *E. coli* a partir da produção de indol em Água Triptonada (AT) (DHSS, 1982). Na etapa presuntiva do teste, as amostras foram incubadas em erlenmeyers contendo Caldo Lauril Tryptose (CLT) a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por $24-48 \pm 2$ h. O resultado positivo presuntivo para CT foi verificado pela alteração da cor de roxo para amarelado e, ou, pela produção de gás. Aliquotas dos frascos positivos com CLT foram repicadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo Caldo Verde Brilhante (VB), incubado à 37°C por 24-48h, Caldo EC (EC) e Água Triptonada (AT), incubados à $44,5^\circ\text{C}$ por 24h (Figura 1). A presença de CT foi confirmada pela produção de ácido (turvação do meio) e pela produção de gás no meio VB. A presença de *E.coli* foi detectada pela produção de indol em AT, verificada a partir da introdução de Reagente Kovac's e pela formação de anel rosa avermelhado.

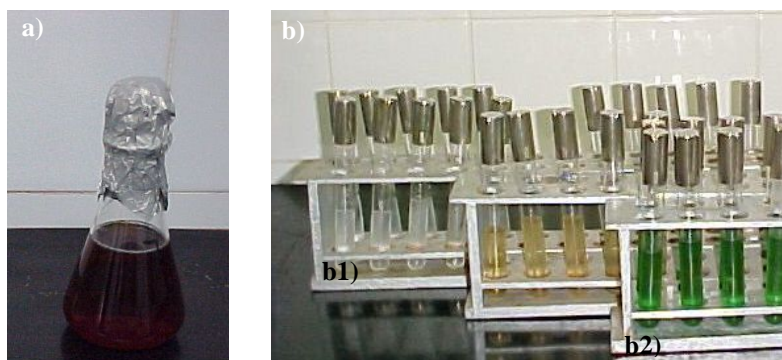


Figura 1: (a) Caldo Lauryl Tryptose (CLT); (b): b1) Caldo Verde Brilhante (VB), e b2) Água Triptonada (AT)

- Teste do substrato enzimático, utilizando dois meios de cultura: Readycult® e Colilert® (Figura 2a).

No Readycult®, após o processamento das amostras e posterior incubação ($24 \pm 2h$, $35 \pm 0,5^\circ C$), a viragem de incolor para verde azulado e a produção de fluorescência com a exposição à luz ultravioleta, caracterizavam, respectivamente, resultados positivos para CT e *E.coli* (Figura 2b). No Colilert®, a viragem de incolor para amarelo e a produção de fluorescência com a exposição à luz ultravioleta, caracterizavam, respectivamente, resultados positivos para CT e *E.coli* (Figura 2c).

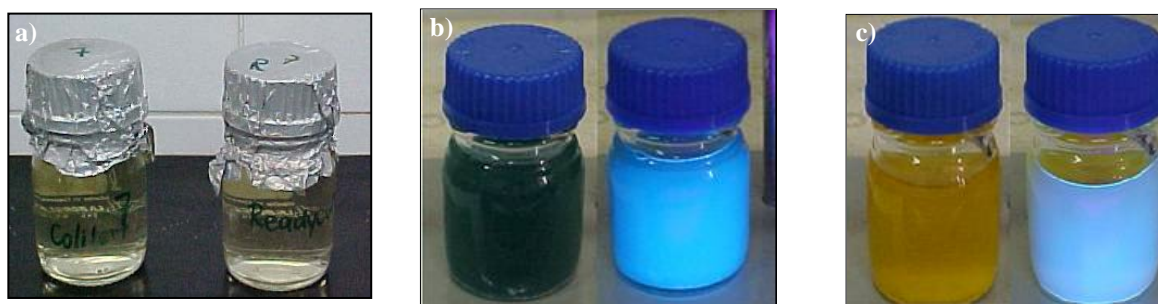


Figura 2: (a) Colilert® e Readycult® (P/A); (b) resultados positivos para coliformes totais e *E. coli* em Readycult® e (c) resultados positivos para coliformes totais e *E. coli* em Colilert®.

Os resultados foram analisados por meio de teste não paramétrico para duas proporções (teste de McNemar), por meio do qual se avalia o grau de discordância de dois tratamentos a que foram submetidos os mesmos indivíduos. As análises estatísticas foram realizadas com o programa BioEstat 2.0 (Ayres et al., 2000) e interpretadas considerando nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

• Rede de distribuição 1 (RD1)

Nas amostras da RD1, o total de resultados positivos para CT em cada meio ou técnica testado foi: Readycult® – 7,4% (8/108); Colilert® – 12,0% (13/108); TF – 1,8% (2/108). As diferenças observadas guardam importância na medida em que podem implicar interpretações diferenciadas sobre o atendimento à norma brasileira de qualidade da água para consumo humano, que exige ausência de CT em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês (BRASIL, 2004).

Oito amostras foram positivas para CT em Readycult®, sendo quatro destas negativas em Colilert®. Dessas quatro amostras, uma foi confirmada como positiva em Caldo Verde Brilhante (VB). As outras quatro amostras positivas em Readycult® também foram positivas em Colilert®, sendo que em apenas uma amostra o resultado foi coincidente nos três meios de cultura/técnicas empregados (Figura 3).

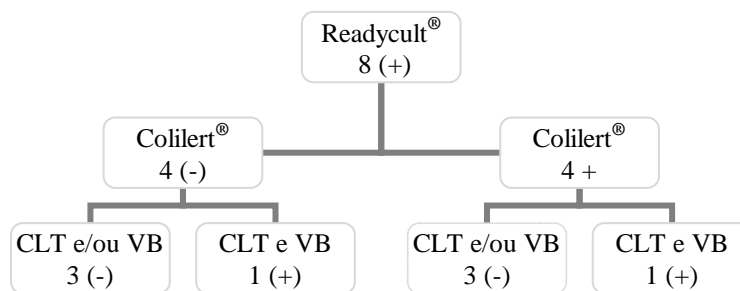


Figura 3: Representação esquemática dos resultados positivos (+) para coliformes totais em Readycult® e correspondência de resultados positivos e negativos (-) em Caldo Lauryl Tryptose (CLT) e Caldo Verde Brilhante (VB), RD1.

Das treze amostras positivas para CT em Colilert®, em nove os resultados não coincidiram com os de Readycult®, sendo que, dentre essas, em oito amostras os resultados foram também negativos ao se confirmar os testes presuntivos de CLT em VB. Como já destacado, em quatro amostras positivas em Colilert®, os resultados foram também positivos em Readycult®, resultando em apenas uma amostra com resultado coincidente nos três meios de cultura/técnicas empregados (Figura 4).

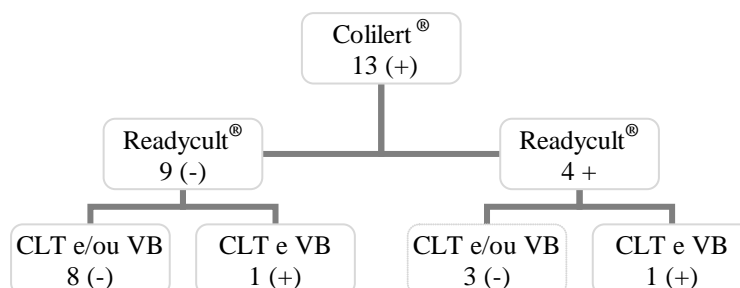


Figura 4: Representação esquemática dos resultados positivos (+) para coliformes totais em Colilert® e correspondência de resultados positivos e negativos (-) em Caldo Lauryl Tryptose (CLT) e Caldo Verde Brilhante (VB), RD1.

Interpretando os resultados por outro prisma, percebe-se que das 108 amostras analisadas, os resultados como emprego dos três meios de cultura/técnicas coincidiram como resultado negativo ou positivo em 89, ou seja, em 82,4% do total de amostras. Nesse mesmo sentido, registra-se que o percentual de congruência entre Readycult® e Colilert® (resultados positivos e negativos em ambos) foi de 85,2% (92/108). A congruência entre os resultados, positivos e/ou negativos, de Readycult® e da TF foi de 82,4% (89/108); entre Colilert® e a TF de 83,3% (90/108). Em relação à presença/ausência de *E. coli*, as três técnicas revelaram resultados equivalentes na grande maioria das amostras, 99,1%. De fato, em apenas uma amostra foi detectada *E.coli* e somente com Colilert®.

• Rede de distribuição 2 (RD2)

Na RD2, o total de resultados positivos para CT, de acordo com o meio de cultura/técnica testada foi: Readycult® – 18,9% (17/90); Colilert® – 17,8% (16/90); TF – 11,1% (10/90). Assim como na RD1, o emprego da TF resultou em menor número de amostras positivas para CT. Entretanto, nesse caso, em qualquer hipótese não estaria atendida a exigência da norma brasileira de ausência de CT em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês (BRASIL, 2004).

Das 17 amostras positivas para CT em Readycult®, em sete os resultados não coincidiram com os de Colilert®, sendo também negativos na TF. Nas outras dez amostras positivas em Readycult®, os resultados foram também positivos em Colilert®. Seis dessas amostras foram negativas na TF. Sendo assim, dentre essas 17 amostras, o resultado positivo foi coincidente nos três meios de cultura/técnicas apenas em quatro eventos (Figura 5).

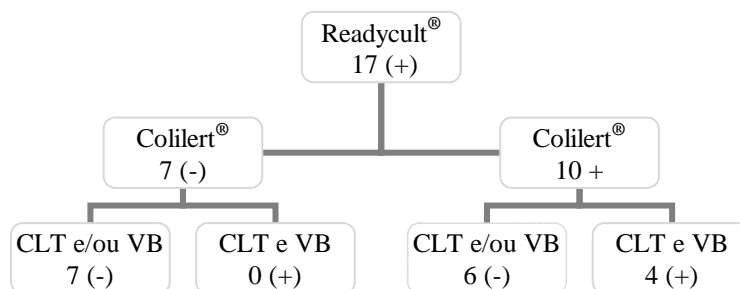


Figura 5: Representação esquemática dos resultados positivos (+) para coliformes totais em Readycult® e correspondência de resultados positivos e negativos (-) em Caldo Lauryl Triptose (CLT) e Caldo Verde Brilhante (VB), RD2.

Das 16 amostras positivas para coliformes totais em Colilert®, em seis os resultados não coincidiram com o de Readycult®. Dessas seis amostras, quatro foram negativas nos testes confirmativos da TF. Como já destacado, nas outras dez amostras positivas em Colilert® o resultado foi também positivo em Readycult®, porém seis negativos na TF (Figura 6).

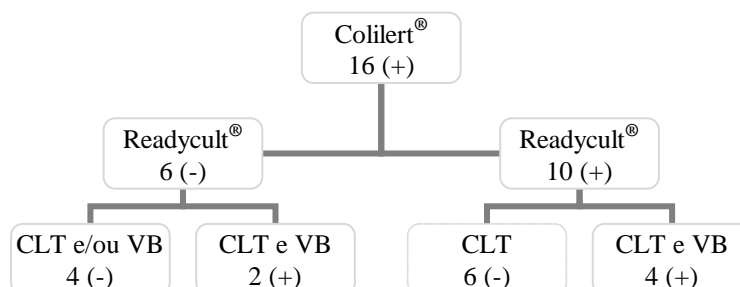


Figura 6: Representação esquemática dos resultados positivos (+) para coliformes totais em Colilert® e correspondência de resultados positivos e negativos (-) em Caldo Lauryl Triptose (CLT) e Caldo Verde Brilhante (VB), RD2.

Das 90 amostras analisadas na RD2, o resultado com o emprego dos três meios de cultura/técnicas coincidiu, como resultado negativo ou positivo, em 64, ou seja, em 71,1% do total de amostras. O percentual de congruência entre Readycult® e Colilert® foi de 77,8% (70/90). A congruência entre os resultados, positivos e/ou negativos, de Readycult® e da TF foi de 71,1% (67/90), e entre Colilert® e a TF de 73,3% (66/90). Em termos de congruência, os resultados são, portanto, inferiores ao que foi observado na RD1. A *E.coli* foi detectada em quatro amostras (4,4%), sendo duas amostras com resultado positivo em todas as técnicas testadas e duas positivas apenas em Readycult®. Assim como na RD1, o percentual de equivalência de resultados para *E. coli* entre as três técnicas comparadas foi elevado (96,7%).

• Total de amostras (RD1 + RD2)

Considerando o total de amostras analisadas (198) nas duas redes de distribuição, o emprego de Colilert® resultou em frequência de detecção de CT mais elevada do que com a utilização, nesta ordem, de Readycult® e da técnica da fermentação da lactose. As discrepâncias em termos de frequência de detecção entre Colilert® e Readycult® foram mais estreitas do que aquelas entre Colilert® e a técnica da fermentação, e entre Readycult® e a técnica da fermentação. Como já referido, a *E.coli* foi detectada em poucas amostras: uma amostra na RD1 (Colilert®) e quatro amostras na RD2 (detecção simultânea nas três técnicas em duas amostras e apenas com Readycult® em outras duas).

As análises estatísticas revelaram diferença significativa apenas entre a detecção de CT com o emprego da TF e do meio cromogênico Colilert®. Em todas as demais situações não houve discordância nos resultados de detecção de coliformes e *E. coli* entre as técnicas empregadas (Tabela 2). Em relação à exceção verificada (teste da fermentação x Colilert®), registra-se que o emprego de Colilert® resultou em maior frequência de detecção de CT.

Tabela 1: Avaliação da concordância/discordância entre os resultados de ocorrência de coliformes totais e *E.coli* nas redes de distribuição 1 e 2, com as três técnicas/meios avaliados.

Avaliação comparativa	Pares concordantes		Pares discordantes	
	χ^2	p ⁽²⁾	χ^2	p ⁽²⁾
Coliformes totais				
TF ⁽¹⁾ x Readycult	140,70	0,000	5,333	0,209
TF ⁽¹⁾ x Colilert	140,671	0,000	10,240	0,001
Readycult x Colilert	118,89	0,000	0,346	0,556
<i>E. coli</i>				
TF ⁽¹⁾ x Readycult	187,127	0,000	0,500	0,480
TF ⁽¹⁾ x Colilert	187,127	0,000	0,000	1,000
Readycult x Colilert	185,13	0,000	0,000	1,000

(1) TF: técnica da fermentação (P/A) e detecção rápida de *E. coli*; (2) diferença significativa p < 0,05

Bonadonna et al. (2007) avaliaram o emprego de Colilert -18/Quanti-Tray®, Agar *E. coli* cromogênico (membrana filtrante -MF) e o método-referência das diretrizes de qualidade de água potável da União Européia (ISO 9308-1): MF com uso de meio de cultura à base de lactose (Agar Lactose TTC) e confirmação com teste do indol. Foram utilizadas amostras de água tratada com inoculação de culturas de *E.coli* (1–50 organismos/100 mL) isoladas de mananciais superficiais e submetidas a estresse por exposição ao cloro. O método ISO resultou em contagens inferiores às dos métodos cromogênicos, além de produzir resultados falso-positivos para *E. coli*. Em resumo, os dois métodos cromogênicos mostraram maior sensibilidade que o método ISO; o Colilert -18®, em particular, produziu melhores resultados qualitativos (maior especificidade) e quantitativos (maior sensibilidade). Edberg et al. (1989) utilizaram Colilert e métodos padronizados no *Standard Methods* (MF e TF) na análise de presença/ausência de CT e *E.coli* em 702 amostras coletadas em diferentes sistemas de distribuição nos EUA. O percentual de congruência dos resultados, positivos e/ou negativos, obtidos com as três técnicas foi de 94% e não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Eckner (1998) analisou 261 amostras de água de consumo humano na Suécia e concluiu que o Colilert® apresentou sensibilidade e especificidade mais elevadas que o método padronizado naquele país (MF utilizando Ágar mEndo-LES, seguido de testes confirmativos para CT e *E.coli*). Olstadt et al (2007) testaram os métodos cromogênicos aprovados pela USEPA mencionados anteriormente na análise de amostras de água contaminadas artificialmente com diferentes bactérias do grupo coliforme (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *E.coli*, *Klebsiella* e *Serratia*). A capacidade de detecção (P/A) de CT e *E.coli* dos meios/métodos testados foi bastante variada; o Colilert® apresentou 100% de eficiência de detecção de CT e de *E. coli*, mas com o Readycult® 20% das amostras analisadas forneceram resultados negativos para CT e, ou *E. coli*. Em outro trabalho de avaliação desses métodos, na análise de amostras de desinfetadas, a maioria dos métodos cromogênicos testados apresentou melhor desempenho na quantificação de CT do que o método tomado como referência (ISO 9308-1). Em testes P/A, Colilert® e Readycult® apresentaram desempenho estatisticamente equivalente na detecção de CT, mas o Colilert® foi mais eficiente na detecção de *E.coli* que o Readycult (WRF, DWI, 2010).

No Brasil, no já referido estudo de Gregghi (2005), a análise de 219 amostras de águas superficiais, subterrâneas e de sistemas de abastecimento, revelou elevada concordância estatística na determinação de CT por Colilert® e Readycult® e a TFTM (tomada como referência). Em relação aos Cter ou *E.coli*, a concordância entre os resultados do Readycult® e da TFTM foi maior do que entre Colilert® e a TFTM. Os dois meios cromogênicos apresentaram elevadas sensibilidade e especificidade na determinação de CT, a especificidade foi também elevada na determinação de *E.coli*, mas o Readycult® mostrou maior especificidade que o Colilert®. Marquezi (2010) analisou amostras de fontes superficiais e subterrâneas e de água tratada em um sistema de abastecimento, utilizando Colilert®, Colitag® e a TFTM. Colilert® e Colitag® se mostraram equivalentes à TFTM na determinação de CT nas amostras de água provenientes da fonte subterrânea e do sistema de abastecimento, e na determinação de *E.coli* nos três tipos de amostras. Nas amostras de água superficial, os métodos cromogênicos forneceram contagens mais elevadas que a TFTM.

Bactérias que não pertencem ao grupo coliforme (por exemplo, espécies de *Aeromonas* e *Pseudomonas*) podem produzir a enzima β -D-galactosidase em pequenas quantidades e, portanto, provocar resultados falso-positivos nos testes cromogênicos. No entanto, isso somente se torna problema quando essas bactérias estão presentes em populações elevadas (>10⁴ UFC/100 mL) (APHA, 2005), o que, certamente, não era o caso nas amostras analisadas no presente estudo. A respeito, no citado trabalho de Olstadt et al (2007) Colilert® e

Readycult® apresentaram elevada capacidade de inibição do crescimento de *Aeromonas* em amostras contaminadas artificialmente com essa bactéria. Por sua vez, algumas cepas de *Shigella* spp. podem produzir fluorescência e resultados falso-positivos para *E.coli*; porém, como a *Shigella* é um patógeno humano, esses eventuais resultados falso-positivos não comprometeriam a avaliação da qualidade sanitária da água.

Em geral, os resultados aqui obtidos estão de acordo com os de trabalhos similares, os quais indicam que as técnicas cromogênicas/fluorogênicas apresentam sensibilidade e especificidade mais elevadas que aquelas baseadas na fermentação da lactose (coliformes) e na produção de indol (*E.coli*) (WRF, DWI, 2010), e que diferenças de desempenho entre métodos cromogênicos/fluorogênicos não sejam tão nítidas. De toda forma, para efeito de avaliação comparativa mais aprofundada dos resultados, tornar-se-ia necessário elucidar se as diferenças observadas (estatisticamente significativas ou não) de detecção de CT e *E.coli* pelas técnicas testadas foram devidas a eventuais resultados falso-positivos ou falso-negativos.

CONCLUSÕES

Na análise qualitativa (presença/ausência) de coliformes totais de 198 amostras de água de redes de distribuição, o emprego de Colilert® resultou em frequência de detecção mais elevada do que com a utilização, nesta ordem, de Readycult® e da técnica da fermentação da lactose. A *E. coli*, indicador mais preciso de contaminação fecal, foi raramente detectada e por vezes, apenas em um ou outro dos dois meios cromogênicos testados (Colilert® e Readycult®). Entretanto, diferença estatisticamente significativa foi observada apenas entre a detecção de coliformes totais com o emprego da técnica da fermentação e de Colilert®. Conclui-se, portanto, que em geral o emprego de Colilert®, Readycult® e da técnica de fermentação da lactose, complementada pelo teste de indol, se mostrou, em geral, equivalente em testes de presença/ausência de coliformes totais e *E.coli* em amostras em redes de distribuição de água tratada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Merck Indústrias Químicas pela concessão de bolsas de Iniciação Científica. À Fapemig, também pelo apoio para participação no Congresso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AWWA – AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WEF – WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st edition. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF, 2005.
2. AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém, Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 2000. 272p.
3. BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P. D.; NASCIMENTO, L. E.; CARVALHO, G. R. M.; SILVA, C. V. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2000, Porto Alegre. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES, 2000. (CD-ROM).
4. BETTEGA, J. M. P. R.; MACHADO, M. R.; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C. A. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n.5, p. 950-954, 2006
5. BONADONNA, L.; CATALDO, C.; SEMPRONI, M. Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination*, v. 213, p 18-23.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. 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. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. p. 266..
7. BRAZ, V.N.; SOUZA, C.L.; BEZERRA, M.S.M.; LOPES, D.F. Comparação entre as técnicas de tubos múltiplos e cromogênica na enumeração de coliformes em águas de praias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001. João Pessoa-PB. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES, 2001 (CD ROM).

8. CANTUSIO NETO, R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. *Higiene Alimentar*, v.15, n.90/91, p. 64-67, 2001.
9. CHERNICHARO, C.A.L.; ZERBINI, A.M.; BITTENCOURT, R.B.. Análise comparativa das técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido, aplicadas à identificação de coliformes em amostras de esgotos brutos e de efluentes anaeróbios. p 61 -79. In: CHERNICHARO, C.A.L (Coord.). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos*. Belo Horizonte: [s.n], 2001. 188 p. (Projeto PROSAB).
10. CERQUEIRA, D. A.; GALINARI, P. C.; BRITO, L. L. A.; AMARAL, G. C. M. Detecção de coliformes fecais pela técnica da membrana filtrante (m FC – 44,5 +/- 0,2 °C) e pelo sistema cromogênico (Colilert – Quanti-Tray 2000). In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, XXVI, Lima-Peru, 1998, *Anais...Lima*: AIDIS, 1998 (anais eletrônicos).
11. DHSS - DEPARTMENT OF HEALTH AND SOCIAL SECURITY. The bacteriological examination of drinking water supplies. Methods for the examination of waters and associated materials. London: DHSS/HMSO, 122 p, 1982. (Report on Public Health and Medical Subjects, 71).
12. ECKNER, K. F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 8, p. 3079-3083, 1998.
13. EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J.; SMITH, D. B., and THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with presence-absence techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n.4, p. 1003-1008, 1989.
14. FRICKER, E. J.; FRICKER C. R. Use of two presence/absence systems for the detection of *E. coli* and Coliforms from water, *Water Research*, v.30, n.9, p. 2226-2228, 1996.
15. GREGHI, S. Q. *Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos*. 2005, 104f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Araraquara, SP, 2005.
16. HAMILTON, W. P.; KIM, M.; THACKSTON, E. L. Comparison of commercially available *Escherichia coli* enumeration tests: Implications for attaining water quality standards. *Water Research*, v.39, n.20, p. 4869-4878, 2005.
17. LIMA, A. M. ANDRADE NETO, C. O.; MELO, J. L. S.; MELO, H. N. S.. Estudo comparativo entre as técnicas de determinação de coliformes fecais e *Escherichia coli* em águas naturais e residuárias utilizando os métodos da membrana filtrante e do substrato cromogênico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, João Pessoa-PB, 2001. *Anais...Rio de Janeiro*: Abes, 2001 (Cd-rom).
18. MANAFI, M.; ROSMANN, H. An evaluation of a new chromogenic / flourogenic microbiology media system for detection of total coliforms and *E. Coli* in water. *Asian Environmental Technology*, v.3,p.7-8, 1999.
19. MARQUEZI, M. C. *Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água*. 2010, 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Araraquara, SP, 2010
20. NIEMELA, S. I.; LEE, J. V.; FRICKER, C. R. A comparison of the International Standards Organization reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure *Journal of Applied Microbiology*, v.95, n.6, p. 1285-1292, 2003.
21. NIKAEEN, M.; PEJHAN, A.; JALALI, M. Rapid monitoring of indicator coliforms in drinking water by an enzymatic assay. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 6, n.1, p. 7-10, 2009.
22. OLSTADT, J.; SCHAUER, J. J.; STANDRIDGE, J.; KLUENDER, S. A comparison of the USEPA approved total coliform/*E.coli* methods. *Journal of Water and Health*, v.5, n.2, p.267-282, 2007.
23. USEPA - US Environmental Protection Agency. Colilert, Colilert-18 Final Approval. 40 CFR Part141, *Federal Register*, Vol. 57, No. 112, June 10, 1992.
24. USEPA - US Environmental Protection Agency. Chromocult and Readycult Coliforms 100. 40 CFR Part 141 (Sec.141.21), *Federal Register*, v.67, n.209, Tuesday, October 29, 2002.
25. WRF – WATER RESEARCH FOUNDATION, DWI – DRINKING WATER INSPECTORATE. *Significance of methods and sample volumes for E. coli and total coliform measurement*. Denver: WRF, 2010, 108p.