

RELAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS PELO PROCESSO DAS MEMBRANAS FILTRANTES E DOS TUBOS MÚLTIPLOS, NO EXAME BACTERIOLÓGICO DE ÁGUA

Eng.º **SEBASTIÃO GAGLIANONE** *

Biologista **MARIA THEREZINHA MARTINS** **

Biologista **PETRA SANHEZ SANCHEZ** ***

A. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A elaboração do presente trabalho foi norteada pelos seguintes objetivos:

1. O emprêgo das membranas filtrantes no exame bacteriológico da água, tem gerado muita controvérsia e polémica. O CETESB, como órgão de govêrno para suporte tecnológico no campo do saneamento básico, sentiu-se na obrigação de travar conhecimento com essa técnica, já conhecida há muito mais de 20 anos, a fim de ganhar sua experiência no assunto e criar condições para uma avaliação, baseada na prática da referida técnica.

2. O processo, pela rapidez de sua realização e pela rápida resposta dos resultados finais (18-24 h), despertou grande interêsse, pois a sua adoção traria o equacionamento do problema do engenheiro que viaja para o interior do Estado, inspecionando serviços de água e esgotos, inspeções que ficam sempre condicionadas ao tempo de armazenamento, que deve ser respeitado entre coleta da amostra e seu exame. A utilização da técnica, com o emprêgo dos «kits portáteis», permitiria obter «in loco», onde nem sempre existem recursos de laboratório, os resultados dos exames e, desta forma, diagnosti-

car a situação encontrada para, a seguir tomar as providências mais imediatas. Por outro lado, a incubação retardada, 24-72 horas, possibilitaria elevar o número de inspeções a realizar numa única viagem do engenheiro ao interior, sempre limitada, conforme foi dito, pelo número de horas que pode ser transcorrido entre a coleta de amostra e sua análise.

3. Tendo havido em nossos laboratórios um grande incremento de exames bacteriológicos, o uso da técnica da membrana filtrante foi novamente cogitado, pois necessitar-se-ia de área menor, para a realização do mesmo número de exames, se comparados com a da técnica padrão dos tubos múltiplos, o que permitiria, evidentemente, o aumento da capacidade de realização de análises para a mesma área disponível.

4. Apesar da técnica já ter sido incluída no «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater», 11.ª edição (1960) e já ser conhecida há mais de 20 anos, conforme foi dito, poucas considerações foram feitas no Brasil, sôbre a mesma. Ao lado dêsse aspecto, o CETESB por ser o órgão máximo de análises de água e águas residuárias no Estado de São Paulo, tem por êsse motivo recebido freqüentes consultas de particulares, indústrias e outros órgãos a respeito, além das várias solicitações de estágios para treinamento nessa específica técnica. Esses fatos vieram a constituir mais uma razão para que se estudasse a técnica das membranas filtrantes.

* Diretor da Divisão de Laboratórios Gerais.

** Chefe da Seção de Bacteriologia-Biologia.

*** Seção de Bacteriologia-Biologia.

Colaboradores:

Técnicos da Seção de Bacteriologia-Biologia

5. Decidido que se faria o estudo, procedeu-se à total revisão da literatura sobre o assunto e a seguir em 26/2/70, o CETESB organizou um simpósio, onde foram debatidos e ouvidas as opiniões e experiências dos especialistas no assunto. Entre outras recomendações do simpósio foi feita a que deu origem ao título do presente trabalho «Relação entre resultados obtidos pelo processo das membranas filtrantes e dos tubos múltiplos, no exame bacteriológico de água» e que também está de acordo com a recomendação contida na 12.^a edição do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater — 1955 da AWWA, onde na página 613, Seção 4, do capítulo referente aos testes de presença dos membros do Grupo Coliforme pela técnica de membrana filtrante, lê-se a seguinte definição:

«Todos os organismos que produzem uma colônia escura (geralmente purpúrea esverdeada) com brilho metálico, dentro de 24 horas de incubação, são considerados membros do Grupo Coliforme. O brilho pode cobrir a colônia inteira ou aparecer somente numa área central ou na periferia. O grupo coliforme assim definido não é necessariamente o mesmo que o descrito na técnica da fermentação em tubos múltiplos, mas provavelmente tem o mesmo significado sanitário, particularmente se estudos adequados foram feitos para estabelecer a **relação entre os resultados obtidos pelo processo do filtro e pelo processo padrão do tubo de diluição** (O grifo é nosso).

Organismos coliformes podem ocasionalmente, produzir colônias que não são típicas em cor ou brilho. Se somente formas atípicas são encontradas suas identificações devem ser estabelecidas.»

É oportuna a transcrição dos parágrafos anterior e do que se segue (pág. 594 — SMWW — AWWA), pois eles contêm definições e esclarecimentos úteis não só para os engenheiros que consultarão o presente trabalho, como para outros técnicos não especialistas em bacteriologia, mas simplesmente consumidores de resultados de exames de água, tanto em projetos de obras, como em interpretações de levantamentos sanitários. «O grupo coliforme inclui todos os bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos, Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose com a formação de gás dentro de 48 horas a 35°C».

Resumindo, a técnica da membrana filtrante não conduz o processo para a produção de gás e sim, está baseado no desenvolvimento de um tipo particular de colônia, em um meio de cultura do tipo Endo (nesse meio a lactose, a

fucsina básica e o sulfito de sódio representam um sistema indicador que permite a diferenciação das colônias de coliformes).

Por conseguinte, mesmo os grupos bacterianos não sendo obrigatoriamente idênticos, provavelmente terão o mesmo significado sanitário, particularmente se estudos adequados forem feitos para estabelecer a relação entre os resultados obtidos pelo processo da membrana filtrante e pelo processo dos tubos múltiplos.

Este trabalho procurou estabelecer em caráter preliminar, a relação acima, dentro das condições de trabalho realmente encontradas num laboratório de rotina. Evidentemente, como em qualquer trabalho sério, seu objetivo principal foi o da tomada de contato com o problema, para então, a seguir, estabelecer condições ideais de trabalho e de aplicabilidade da técnica. Ele visou também treinar o pessoal de laboratório na técnica da membrana filtrante.

B. SUMARIO

Procurou-se estabelecer a relação entre os resultados obtidos nos exames bacteriológicos empregando-se as técnicas dos tubos múltiplos e das membranas filtrante (MF). Foram agrupadas e analisadas águas de elevada e baixa densidade de coliformes.

1. Técnica de laboratório

1.1. Águas com densidade elevada de coliformes: % de concordância = 61% e índice de correlação = 0,74.

1.2. Águas com baixa densidade de coliformes: % de concordância = 91,6% e índice de correlação = 0,44 e 0,82 (eliminando-se uma amostra bastante discrepante).

2. Técnica de campo

2.1. Teste imediato: Relação NMP/MF: % de concordância = 68% e índice de correlação = 0,53.

2.2. Teste retardado (24 horas): Relação NMP/MF: % de concordância = 54,2% e índice de correlação = 0,01.

2.3. Relação MF imediato/MF retardado (24 horas): % de concordância = 54,2% e índice de correlação = 0,89.

Para a técnica de campo foi feita também, **avaliação qualitativa** não se levando em consideração o número ou densidade de bactérias, isto é, somente considerando a presença ou ausência de coliformes:

- presente nos dois testes: 52,9%;
- ausente nos dois testes: 25,9%;
- presente apenas nas membranas: 9,1%;
- presente apenas nos tubos múltiplos: 11,8% porém, dos 22 casos encontrados apenas 8 apresentaram NMP variando de 46 a 790, enquanto que nos demais casos (14) o NMP foi sempre inferior a 23.

Foram feitas a partir destes resultados, recomendações para os trabalhos de campo.

Foram também verificados vários problemas que podem surgir na técnica de campo e os meios empregados para preveni-los.

3. Foi estudada a influência do tempo e da temperatura de armazenamento na técnica de incubação retardada (em laboratório realizado em paralelo MF e tubos múltiplos), cujos resultados foram lançados em gráficos.

Verificamos no armazenamento até 48 horas:

- que não houve grande variação de resultados, em relação ao teste imediato (tubos múltiplos e MF);
- que o uso do M-Endo agar favoreceu a adaptação da membrana no «pad absorvente» propiciando melhor crescimento.

Esta verificação de pequena variação entre os resultados em paralelo (MF e tubos múltiplos), em laboratório, está aparentemente contraditória com os resultados obtidos em campo, onde a correlação e a % de concordância no ensaio de incubação retardada, foi pouco significativa; em vista desta constatação estamos pesquisando o problema e uma vez obtidos os resultados serão motivos de comunicação.

C. MATERIAL E MÉTODOS DE ANÁLISES

1. Tipos de águas analisadas

Foram selecionadas para o estudo, águas «in natura» de várias densidades de coliformes: mananciais do sistema de abastecimento da área metropolitana de São Paulo, fontes de estâncias hidrominerais, poços e nascentes.

2. Métodos de exames efetuados

2.1. Para as técnicas dos tubos múltiplos, utilizamos as técnicas-padrão americanas, sendo que foram feitos os ensaios: presuntivo, confirmativo e completo.

2.2. Para a técnica das membranas filtrantes utilizamos os filtros «Millipore» HAWGO-047 e o meio M-Endo (Difco ou BBL).

A contagem das colônias foi feita com um microscópio binocular estereoscópico; na iluminação foi empregada lâmpada fluorescente com um ângulo de incidência de mais ou menos 80°.

2.3. Para o ensaio de campo foram usados os «kits» portáteis «Millipore»; no teste imediato usamos o meio de cultura M-Endo contido em ampolas fornecidas pelo próprio fabricante e para o teste de incubação retardado o meio M-Endo benzoatado (preparado em laboratório).

2.4. No estudo da influência do tempo e temperatura de armazenamento para o método de incubação retardada, além do meio M-Endo usamos o agar M-Endo, para verificar em qual dos dois meios haveria melhor crescimento.

O volume de amostra a ser filtrada foi condicionada à colimetria esperada, à turbidez da amostra e ao número de não-coliformes presentes na amostra. Foram efetuadas, geralmente, uma série de três filtrações com volumes diferentes de amostra e, após a incubação, escolhemos a placa que apresentava um número entre 20 a 200 colônias.

D. PROGRAMAÇÃO DO TRABALHO

O trabalho foi subdividido em:

1. Estudos sobre testes para a presença de membros do grupo coliforme pela técnica de membrana filtrante (com emprêgo de equipamento de laboratório), paralelo à técnica dos tubos múltiplos.

1.1. Em águas com densidade elevada de coliformes (Tabelas I e I-A).

1.2. Em águas com baixa densidade de coliformes (Tabelas II e II-A).

2. Estudos sobre testes para a presença de membros do grupo coliforme pela técnica das membranas filtrantes (empregando o equipamento de campo), em paralelo à técnica dos tubos múltiplos.

2.1. Testes imediatos e retardados (24 horas) — (Tabelas III e III-A).

2.2. Testes para verificar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento para o ensaio retardado. (Tabelas IV e IV-A e gráficos correspondentes).

E. CRITÉRIOS PARA COMPARAÇÃO

Tabelamos os resultados obtidos e procuramos verificar a concordância entre os resultados dos métodos dos tubos múltiplos e das membranas filtrantes, por intermédio de um estudo de correlação.

Também consideramos o número de colônias de coliformes (MF) como concordantes com o NMP, quando aquele resultado (MF) estivesse dentro dos limites inferior e superior estabelecidos para o NMP encontrado (de acordo com o critério adotado nos trabalhos citados na Bibliografia: 1, 4 e 7).

Exemplo: Tubos múltiplos: NMP coliformes/100 ml = 490; Limite inferior = 170 e Limite superior = 1.300.

Membranas filtrantes: número de colônias de coliformes/100 ml = 340 (dentro dos limites de confiança de 95% do NMP), portanto em concordância.

F. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Comparação entre tubos múltiplos e membranas filtrantes (equipo de laboratório).

1.1. Grupo de águas com várias densidades de coliformes.

TABELA I

Origem	Tubos múltiplos NMP coliformes/100 ml	Limite confiança de 95% (NMP)		Membranas filtrantes — N.º de colônias/100 ml	Concordância
		L. I.	L. S.		
Reprêsa 1	490	170	1.300	340	sim
	172	43	490	2.200	não
	175	44	500	280	sim
	1.300	350	3.000	2.400	sim
	330	110	930	530	sim
	79	25	190	230	não
	70	23	170	180	não
	348	120	1.000	300	sim
	230	70	700	100	sim
	33	11	93	100	não
49	17	130	380	não	
Reprêsa 2	1.750	440	5.000	17.000	não
	54.200	18.000	140.000	500.000	não
	34.800	12.000	100.000	13.300	sim
	24.000	6.800	75.000	50.000	sim
	22.100	5.700	70.000	16.000	sim
	24.000	6.800	75.000	31.000	sim
	34.800	12.000	100.000	65.000	sim
	1.750	440	5.000	2.100	sim
	790	250	1.900	1.900	sim
	10.900	3.100	25.000	13.000	sim
	3.300	1.100	9.300	2.500	sim
	4.900	1.700	13.000	7.400	sim
	7.900	2.500	19.000	7.000	sim
	10.900	3.100	25.000	2.700	não
2.210	570	7.000	3.000	sim	
Reprêsa 3	46	16	120	380	não
	109	31	250	720	não
	94	28	220	5.700	não
	49	177	130	50	sim
	23	7	70	30	sim
Reprêsa 4	130	30	310	1.210	não
	130	35	300	2.030	não
	1.300	350	3.000	1.100	sim
	400	150	1.140	520	sim
	918	300	3.200	350	sim
	460	160	1.200	290	sim

Origem	Tubos múltiplos NMP coliformes/100 ml	Limite confiança de 95% (NMP)		Membranas filtrantes — N.º de colônias/100 ml	Concordância
		L.I.	L.S.		
Reprêsa 5	221	57	700	430	sim
	49	17	130	270	não
	27	9	80	650	não
	70	23	170	50	sim
	27	9	80	70	sim
Reprêsa 6	790	250	1.900	2.500	não
	790	250	1.900	210	não
	490	170	1.300	820	sim
	1.720	430	4.900	300	não
	79	25	190	140	sim
Reprêsa 7	141	37	340	50	sim
	172	43	490	650	não
	130	35	300	250	sim
Nascente	70	23	170	180	sim
	2.780	900	8.500	230	não
Reprêsa 9	280	70	700	110	sim
	34	12	93	590	não

TABELA I - A

Análise dos dados obtidos

1. Exames parcelados das represas

Origem	% de Concordância	% amostra NMP > MF	% amostra NMP < MF	Volume da amostra filtr. (ml)	Mediana Relação NMP/MF
Reprêsa 1	54,5	27,3	72,7	10	0,58
Reprêsa 2	80,0	33,3	66,6	1	0,84
Reprêsa 3	40	zero	100	10	0,13
Reprêsa 4	66,6	50	50	10	0,53
Reprêsa 5	60	20	80	10	0,18
Represa 6	50	50	50	10 e 1	2,51

2. Exame total dos dados obtidos

Total de amostras	% de Concordância	% amostra NMP > MF	% amostra NMP < MF	Índice de Correlação
53	61	31,5	68,5	0,74

Observação: As demais represas não foram analisadas isoladamente porque não apresentavam número de dados suficientes.

1.2. Grupo de águas com baixa colimetria

TABELA II

Origem Fonte	Tubos múltiplos NMP colifor- mes/100 ml	Limite confiança de 95% (NMP)		Membranas filtrantes — N.º de colô- nias/100 ml	Concor- dância
		L.I.	L.S.		
Am. 1	zero	zero	6	1	sim
Am. 2	13	3,5	30	4	sim
Am. 3	zero	zero	6	zero	sim
Am. 4	zero	zero	6	zero	sim
Am. 5	33	11	93	30	sim
Am. 6	5	zero	94	3	sim
Am. 7	13	35	30	26	sim
Am. 8	zero	zero	6	zero	sim
Am. 9	5	zero	13	2	sim
Am. 10	zero	zero	6	1	sim
Am. 11	zero	zero	6	zero	sim
Am. 12	2	zero	7	3	sim
Am. 13	2	zero	7	4	sim
Am. 14	7	1	17	8	sim
Am. 15	8	1	19	2	sim
Am. 16	2	zero	7	zero	sim
Am. 17	zero	zero	6	zero	sim
Am. 18	zero	zero	6	13	não
Am. 19	zero	zero	6	zero	sim
Am. 20	zero	zero	6	zero	sim
Am. 21	zero	zero	6	zero	sim
Am. 22	zero	zero	6	zero	sim
Am. 23	47	16	120	zero	não
Am. 24	zero	zero	6	zero	sim

TABELA II-A

Análise dos dados obtidos
(Interpretação)

N.º amostras examinadas	% amostras Concordantes	% amostras		% amostras resultados iguais (no caso = 0)	Índice de Correl.
		NMP	MF		
24	91,6	29,2	29,2	42,5%	0,44 *

* No cálculo da correlação, se eliminarmos a única amostra discrepante (referente à amostra 23) — o índice de correlação eleva-se a 0,82.

2. Comparação entre tubos múltiplos e membranas filtrantes (equipamento de campo):

2.1. Testes imediatos e retardados

TABELA III

Origem	NMP coli/100 ml	Limite de confiança 95% (NMP)		Teste de Campo N.º colônias coli/100 ml	
		L.I.	L.S.	I.	R. (24 h)
(1)					
Fonte 1A	23	7	70	3	> 200
Fonte 1B	4	< 0,5	11	zero	15
Fonte 1C	2	< 0,5	7	2	13
Fonte 1D	7	1	17	4	zero
Fonte 1E	8	1	19	3	3
Fonte 1F	2	< 0,5	7	1	7
Fonte 1G	2	< 0,5	7	7	8
Poço 1A	5	< 0,5	13	1	27
Poço 1B	zero	zero	6,0	2	52
Poço 1C	8	1	19	4	9
Poço 1D	17	5	46	1	27
Poço 1E	2	< 0,5	7	4	14
Poço 1F	2	< 0,5	7	7	36
(2)					
Fonte 2A	73	25	190	1	...
Fonte 2B	zero	zero	6,0	2	...
Fonte 2C	34	12	93	> 200	...
Fonte 2D	23	7	70	> 200	...
Fonte 2E	2	< 0,5	7	4	...
Fonte 2F	13	3	31	3	...
Fonte 2G	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 2H	zero	zero	6,0	5	...
Fonte 2I	2	< 0,5	7	1	...
Fonte 2J	zero	zero	6,0	zero	...
(3)					
Fonte 3A	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 3A	46	16	120	zero	zero
Reprêsa 3B	278	90	850	zero	zero
Reservatório 3A	348	120	1.000	zero	zero
Reservatório 3B	790	250	1.900	zero	zero
(4)					
Fonte 4A	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 4B	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 4C	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 4A	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 4B	46	16	120	2.500	12.800
Reprêsa 4C	40	17	130	zero	zero
Reprêsa 4D	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 4E	5	< 0,5	13	7	2
Reprêsa 4F	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 4G	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 4H	490	170	1.300	> 200	6.300
Reprêsa 4I	3.480	1.200	10.000	40	> 200
Reserv. 4A	zero	zero	6,0	zero	zero

Origem	NMP coli/100 ml	Limite de confiança 95% (NMP)		Teste de Campo N.º colônias coli/100 ml	
		L.I.	L.S.	I.	R. (24 h)
(5)					
Poço 5A	zero	zero	6,0	6	1
Poço 5B	8	1	19	13	11
Fonte 5A	13	3	31	7	9
Fonte 5B	zero	zero	6,0	zero	1
Fonte 5C	zero	zero	6,0	6	1
Fonte 5D	zero	zero	6,0	7	2
Fonte 5E	330	110	930	200	29
Fonte 5F	33	11	93	200	11
Fonte 5G	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 5H	zero	zero	6,0	2	1
Fonte 5I	345	120	1.000	17	55
Fonte 5J	79	25	190	12	34
Fonte 5K	2	0,5	7	zero	10
Fonte 5L	5	0,5	13	2	4
Fonte 5M	zero	zero	6,0	zero	...
Piscina 5A	zero	zero	6,0	zero	zero
Piscina 5B	2	0,5	7	zero	zero
(6)					
Piscina 6A	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 6A	172	43	490	16	...
Fonte 6B	5	0,5	13	4	...
Fonte 6C	542	180	1.400	36	...
(7)					
Fonte 7A	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 7B	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 7C	130	35	300	16	...
Fonte 7D	13	3	31	14	...
Fonte 7E	2	0,5	7	24	...
Fonte 7F	33	11	93	200	...
Fonte 7G	17	5	46	10	...
Fonte 7H	13	3	31	14	...
Fonte 7I	2	0,5	7	zero	...
Fonte 7J	2	0,5	7	2	...
Fonte 7L	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 7M	542	180	1.400	200	...
Fonte 7N	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 7O	13	3	31	20	...
Fonte 7P	27	9	80	200	...
Fonte 7Q	240	68	750	2	...
Fonte 7R	5	0,5	13	16	...
Riacho 7A	3.480	1.200	10.000	300	...
Riacho 7B	11	2	25	4	...
Poço 7A	23	7	70	45	...
Piscina 7A	zero	zero	6,0	zero	...
Piscina 7B	2	< 0,5	7	zero	...
(8)					
Fonte 8A	2	< 0,5	7	3	3
Fonte 8B	2	< 0,5	7	1	2
Fonte 8C	33	11	93	4	12
Fonte 8D	zero	zero	6,0	1.600	4.600
Fonte 8E	109	31	250	zero	1
Fonte 8F	130	35	300	12	2
Fonte 8G	348	120	1.000	> 200	zero
Fonte 8H	17	5	46	5	1
Rio 8A	3.480	1.200	10.000	200	30
Rio 8B	109	31	250	7	7

Origem	NMP coli/100 ml	Limite de confiança 95% (NMP)		Teste de Campo N.º colônias coli/100 ml	
		L. I.	L. S.	I.	R. (24 h)
(9)					
Manancial 9A	1.410	370	3.400	> 200	> 200
Tratada 9A	zero	zero	6,0	zero	zero
Reservatório 9A	2	< 0,5	7	30	7
Reservatório 9B	1.720	430	4.900	> 200	> 200
Rio 9A	zero	zero	6,0	zero	> 200
Fonte 9A	2.780	900	8.500	> 200	> 200
Fonte 9B	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 9C	79	25	190	6	> 200
Fonte 9D	109	31	250	> 200	zero
Fonte 9E	5	< 0,5	13	3	3
Fonte 9F	zero	zero	6,0	3	4
Fonte 9G	278	90	850	12	> 200
(10)					
Fonte 10A	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 10B	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 10C	zero	zero	6,0	1	85
Poço 10A	2	< 0,5	7	zero	5
Poço 10B	zero	zero	6,0	zero	zero
Poço 10C	13	3	31	3	zero
Reservatório 10A	zero	zero	6,0	1	18
(11)					
Fonte 11A	5	< 0,5	13	zero	...
Fonte 11B	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 11A	230	70	700	8	...
Reprêsa 11B	230	70	700	zero	22
Reprêsa 11C	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 11D	zero	zero	6,0	zero	zero
Reprêsa 11E	130	30	310	zero	> 200
Reprêsa 11F	460	160	1.200	18	...
Reprêsa 11G	zero	zero	6,0	zero	zero
(12)					
Fonte 12A	zero	zero	6,0	2	...
Fonte 12B	33	11	93	2	...
Fonte 12C	13	3	31	zero	...
Fonte 12D	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 12E	2	< 0,5	7	1	...
Poço 12 A	zero	zero	6,0	zero	...
Reservatório 12A	zero	zero	6,0	zero	...

Origem	NMP coli/100 ml	Limite de confiança 95% (NMP)		Teste de Campo N.º colônias coli/100 ml	
		L.I.	L.S.	I.	R. (24 h)
(13)					
Fonte 13A	49	17	130	> 200	> 200
Fonte 13B	13	3	31	72	...
Fonte 13C	17	5	45	9	54
Fonte 13D	33	11	93	8	10
Fonte 13E	240	63	750	26	3
Fonte 13F	13	3	31	10	zero
Fonte 13G	8	1	19	6	zero
Fonte 13H	14	4	34	10	...
Fonte 13I	zero	zero	6,0	zero	1
Fonte 13J	2	< 0,5	7	3	...
Fonte 13K	zero	zero	6,0	zero	2
Fonte 13L	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 13M	130	35	300	28	...
Fonte 13N	2	< 0,5	7	8	...
Reservatório 13A	130	35	300	zero	...
Reservatório 13B	1.600	640	530	> 200	...
Reservatório 13C	230	70	700	> 200	45
Reservatório 13D	34	12	93	5	...
Poço 13A	2	< 0,5	7	6	...
Poço 13B	49	17	160	30	> 200
Piscina 13A	zero	zero	6,0	3	...
Rêde 13A	8	1	19
Rêde 13B	33	11	93	36	...
Ribeirão 13A	2	< 0,5	7	zero	zero
Ribeirão 13B	23	7	70	5	...
(14)					
Fonte 14A	2	< 0,5	7	1	...
Fonte 14B	zero	2	21	4	...
Fonte 14C	zero	zero	6,0	5	...
Fonte 14D	21	7	63	9	...
Fonte 14E	5	< 0,5	13	6	...
Rêde 14A	zero	zero	6,0	3	...
Rêde 14B	6	< 0,5	15	20	...
Rêde 14C	5	< 0,5	13	zero	...
Tratada 14A	17	5	46	zero	...
Nascente 14A	130	35	300	13	...
Nascente 14B	175	44	500	8	...
Reservatório 14A	12	3	28	zero	...
Piscina 14A	zero	zero	6,0	zero	...
Piscina 14B	zero	zero	6,0	zero	...
Rio 14A	4.900	1.700	13.000	5.000	...
Rio 14B	zero	zero	6,0	zero	...
Reprêsa 14A	1.090	310	2.500	> 200	...
(15)					
Fonte 15A	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 15B	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 15C	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 15D	5	< 0,5	13	13	17
Fonte 15E	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 15F	23	7	70	1	zero
Fonte 15G	zero	zero	6,0	1	7
Fonte 15H	5	< 0,5	13	13	...
Fonte 15I	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 15J	23	7	70	zero	...
Fonte 15K	zero	zero	6,0	1	...
Fonte 15L	zero	zero	6,0	zero	...
Fonte 15M	zero	zero	6,0	zero	zero
Fonte 15N	zero	zero	6,0	zero	zero

TABELA III-A

Análise dos dados obtidos nos exames efetuados em amostras de água de fontes, poços, represas, rios, piscinas, reservatórios e rãdas, provenientes de várias cidades do interior do Estado de São Paulo.

Testes MF -- (campo). Imediato e Retardado 24 horas. Em paralelo aos tubos múltiplos.

Relação MF/NMP	Concordantes (dentro dos limites de confiança de 95% do NMP)	Negativos nos dois testes	Não concordantes	Discrepantes		% de concordância	Índice de correlação
				MF/NMP (NMP = zero ou em quantidades bastante inferiores ao MF)	NMP/MF (MF = zero ou em quantidades bastante inferiores ao NMP)		
Imediato	78	48	27	6	18	68,1	0,53
Sub-totais		126	27		24	Total de pares estudados = 185	
Retardado (24 h)	32	26	26	5	10	54,2	0,01
Sub-totais		58	26		15	Total de pares estudados = 105	

Relação entre o teste de membranas filtrantes imediato Retardado (24 horas)

Mesmo resultado	Resultados próximos intervalo (2)	Não concordantes I > R I < R		Total de pares	Índice de correlação	% de concordância
41	16	18	30	105	0,89	54,2

TABELA IV

Estudo sobre a influência da temperatura e do tempo de armazenamento na técnica de incubação retardada em membranas filtrantes.

REPRESA N.º	NMP colif/100 ml	NÚMERO DE COLONIAS DE COLIFORMES/100 ML													
		IMEDIATO		RETARDADO											
				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
		AMBIENTE		GELADEIRA		AMBIENTE		GELADEIRA		AMBIENTE		GELADEIRA			
		s/ agar	c/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
9	49	25	40	120	160	95	25	110	70	120	105	120	75	65	5
9A	33	zero	60	90	60	40	20	160	40	30	40	70	190	70	180
3	70	zero	40	10	20	110	35	45	15	40	35	35	10	35	15
7	172	20	60	80	50	60	30	100	60	40	50	prejudicada	zero	60	60
1	175	15	60	100	35	90	50	50	30	30	60	35	zero	60	30
5	330	10	20	zero	30	20	zero	70	20	30	20	50	10	20	10

TABELA IV-A

Origem	IMEDIATO		24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
			AMBIENTE		GELADEIRA		AMBIENTE		GELADEIRA		GELADEIRA			
Reprêsa N.º	s/ agar	c/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar	c/ agar	s/ agar
	9	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9A	o	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	o	x	o
3	o	x	o	o	x	x	x	o	x	x	x	o	x	o
7	o	x	x	x	x	o	x	x	o	x	**	o	x	x
1	o	x	x	o	x	x	x	o	o	x	o	o	x	o
5*	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

* Todos os resultados obtidos abaixo do limite inferior do NMP.

x: concordante.

** Colmatado.

o: não concordante.

OBS.: 1) Com 48 horas de armazenamento à temperatura ambiente, as placas apresentaram crescimento de colônias atípicas, mesmo antes do início da incubação (na maioria das vezes).

2) Em 72 horas do armazenamento à temperatura ambiente, as placas apresentaram crescimento de colônias atípicas e algumas com brilho verde metálico característico, antes da incubação, na maioria das vezes).

3) Com armazenamento em geladeira, não houve nenhum crescimento.

DISCUSSÃO SOBRE OS DADOS OBTIDOS

1. Relação entre o número de colônias de coliformes obtida pela técnica das membranas filtrantes e pela técnica dos tubos múltiplos (laboratório).

1.1. Água com elevada densidade de coliformes:

% de amostras concordantes: 61%.

Índice de correlação: 0,74.

1.2. Água com baixa densidade de coliformes:

% de amostras concordantes: 91,6%.

a) Índice de correlação: 0,44.

b) Índice de correlação: 0,82 (sendo abandonado um dado extremamente discrepante).

Obs.: Kabler (1) trabalhando indiferentemente com os vários tipos de água encontrou uma porcentagem de concordância de 75,1 a 79,2%.

Com águas potáveis obtivemos melhor índice de correlação e de % de concordância, pois pudemos examinar volumes (aliquotas) de amostras maiores e ainda não houve interferência de turbidez e de organismos não coliformes.

Certas águas «in natura» com valores elevados de turbidez e de densidade de coliformes e não-coliformes apresentaram menor concordância com o NMP, pois o volume de amostra filtrada tornava-se bastante pequeno (pois a técnica prevê que se encontre de 20 a 80 colônias típicas de coliformes por placa, sendo que o total de colônias entre coliformes e não-coliformes não deve ultrapassar 200).

2. Nos trabalhos de campo, principalmente no ensaio de incubação retardada, a correlação e a % de concordância entre a técnica dos tubos múltiplos e o ensaio retardado foi pouco significativa. (Ver Sumário 2.1, 2.2 e 2.3).

Possíveis dificuldades que podem surgir com a técnica Millipore de Campo:

2.1. Formação de vácuo e conseqüente interrupção da filtração com perda do conjunto placa-filtro:

Meio de evitar esta dificuldade: conservar o dispositivo plástico, que fica acoplado à seringa, mergulhado na amostra de água até o término da filtração.

2.2. Crescimento bacteriano «espraiado» ou ainda, agrupamento de colônias num só lado da membrana prejudicando a contagem, cujas causas podem ser:

-- o excesso de água que eventualmente fica sobre a membrana filtrante, fazendo com que o material retido sobre a mesma se movimente para as laterais da placa, impedindo uma distribuição homogênea das colônias;

-- esse mesmo excesso de líquido, quando do crescimento das colônias contribui para a união das mesmas, fazendo com que se «espraíem» sobre toda a membrana.

O excesso de água torna mais difícil a difusão do meio de cultura dificultando o trabalho.

Modos de evitar esta dificuldade:

-- ao término da filtração, esgotar totalmente a água que ficar retida sobre a membrana filtrante com a seguinte manobra: inverter a posição do equipamento e acionar o êmbolo da seringa, em movimento de sucção até encontrar resistência

2.3. A manobra pode ser deslocada da superfície do «pad» absorvente. Neste caso, o teste fica prejudicado, pois as bactérias retidas na membrana, não são nutridas pelo meio de cultura e não têm, portanto, capacidade de se desenvolverem. Quando se tentar acomodar a membrana sobre uma nova placa para incubação em laboratório não se conseguirá bons resultados, pois há sempre inclusão de «bôlhas de ar».

Modo de evitar esta dificuldade:

-- ao acrescentar o meio de cultura acondicionado em ampolas ou por intermédio de pipeta, não forçar o «pad» absorvente, para obter escoamento mais rápido.

2.4. A quantidade de meio de cultura a ser adicionada, que é função da espessura do meio absorvente, é crítica: não deve haver excesso (por causa do espraiamento de colônias), nem falta de meio (algumas zonas podem não ser impregnadas pelo meio). Nos trabalhos realizados por nós, foram suficientes os seguintes volumes:

1,6 ml M-Endo -- Técnica de laboratórios

0,9 ml M-Endo -- Técnica de campo

3. Qualitativamente, os dados obtidos pela técnica de campo, ensaio imediato, se relacionados com a técnica dos testes múltiplos, mostraram nas 185 amostras estudadas:

3.1. 52,9% de casos «com presença de coliformes nos dois testes» — não se considerando as quantidades.

3.2. 25,9% de casos «de ausência de coliformes nos dois testes».

3.3. 9,1% de casos de «presença de coliformes apenas nas membranas filtrantes e ausência nos tubos múltiplos».

3.4. 11,8% de casos de «presença de coliformes nos tubos múltiplos e ausência nas membranas filtrantes».

Para trabalho de campo cremos que este último dado é importante e desta forma procuramos relacionar os 22 casos de «NMP coliformes (tubos múltiplos) com os casos de ausência de coliformes nas membranas filtrantes».

NMP coli/100 ml	MF
46	zero
49	zero
109	zero
130	zero
230	zero
278	zero
348	zero
790	zero

isto é:

8 casos de NMP (tubos) relativamente elevados, positivos, contra 8 (MF) negativos (zero);

14 casos: NMP < 23 contra MF (zero).

Recomendamos desta forma, no campo:

- sejam analisadas mais de uma amostra, coletadas no mesmo instante;
- sejam levados em consideração os resultados que apresentarem grande crescimento de colônias não típicas de coliformes.

4. Os testes realizados para verificar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento sobre o ensaio retardado mostraram que:

4.1. Os resultados de membranas incubadas com M-Endo agar, apresentaram geralmente, índice de concordância (dentro dos limites de segurança de 95% do NMP — tubos) maior.

4.2. Os resultados de membranas, com 24 e 48 horas de armazenamento (laboratório) não acusaram variação significativa, tanto se armazenados na geladeira (4°C) ou em temperatura ambiente (mais ou menos 23°C).

4.3. No armazenamento de 72 horas, houve grande número de resultados não concordantes, principalmente nas amostras armazenadas na temperatura ambiente: este estudo está prosseguindo, pois julgamos que os dados obtidos não são expressivos e não permitem apreciação conclusiva.

BIBLIOGRAFIA

- KABLER, Paul W. — «Water examination by membrane filter and most probable number procedures» (Report of a field study of the Standard Methods Committee for the examination of water and sewage). Reprinted from American Journal of Public Health, volume 44, n.º 3, March 1954.
- THOMAS Jr., Hardd A.; WOODWARD, Richard S.; KABLER, Paul, W. — «Used of molecular filter membranes for water potability controls». Reprinted from and copyrighted as a part of Journal American Water Works Association, volume 48, n.º 11, November 1956.
- GELDREICH, Edwin E. — «Status of bacteriological procedures used by state and municipal laboratories for potable water examination». Reprinted from Health Laboratory Science, volume 4, n.º 1, January 1967.
- LEIGUARDA, Ramon, H.; MURATORIO, Amleto J. (laboratórios da O.S.N.) — «La tecnica de las membranas filtrantes en el examen bacteriologico del agua». Trabalho apresentado no 6.º Congresso da A.I.D.I.S. Porto Rico, Mayo 1958.
- «Acceptance of membrane filter procedure». Report of A.W.W.A. Action, págs. 72 a 74.
- GELDREICH, Edwin E.; KABLER, Paul W.; JETER, Harold L.; CLARK, Harold F. — «A delayed incubation membrane filter test for coliform bacteria in water». Reprinted from American Journal of Public Health, volume 45, n.º 11, November 1955.
- ADAMS, Reginal B. — «Comparison of standard dilution and membrane filter methods». Journal A.W.W.A., November 1957, págs. 1492 a 1458.
- HERDERSON, W. L. — «Studies pon the use of membrane filters for the estimation of coliform densities in sea water». Sewage and industrial wastes, January 1959, págs. 78 a 91.

9. MCKEE, Jack E.; MCLAUGILLIN, Ronald S. — «Application of molecular techniques to the bacterial assay of sewage» (Experimental results for settled sewage). *Sewage and Industrial wastes*, February 1958, págs. 129 a 137.
10. GELDREICH, Edwin E.; JETER, H. L.; WINTER, J. A. — «Technical considerations in applying the membrane filter procedure». Reprinted from *Health Laboratory Science*, volume 4, n.º 2, April 1967.
11. *Standard Methods for the examination of water and wastewater* — 12.ª edição, 1965.
12. *Standard Methods for the examination of water and wastewater* — 11.ª edição, 1960.
13. CATALOGOS:
 - a) Millipore — Experiments in microbiology — catálogo LTPB 071 BE.
 - b) Millipore — Filters and associated apparatus — catálogos MF-64 e MF-67.
 - c) Millipore — Microbiological Analysis of water and milk — catálogo ALM-60.
 - d) Millipore — Detection and analysis of contamination — catálogo ADM-30.
 - e) Millipore — Techniques for microbiological analysis — catálogo ADM-40.
 - f) Sartorius membranfilter — membrane filters, filter holders and accessories — catálogo 1970.
 - g) Sartorius membranfilter — Técnicas microbiológicas para água, bebidas y alimentos — catálogo SM-11.