

Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água

Comparison of methods for analysis of total coliforms and *E. coli* in water samples

RIALA6/1291

Marina Chiarelli MARQUEZI^{1*}, Cláudio Rosa GALLO¹, Carlos Tadeu dos Santos DIAS²

Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) Avenida Pádua Dias, 11. CP 09. CEP 13418-900. Piracicaba – SP, Fone: (19) 3429-4131, email: marinamarquezi@gmail.com

²Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP)

Recebido: 24.06.2010 – Aceito para publicação: 30.09.2010

RESUMO

Neste estudo foram realizadas as contagens de coliformes totais e de *E. coli* por meio de três metodologias (fermentação em tubos múltiplos - FTM, Colilert e Colitag) em amostras de água coletadas de três diferentes pontos (abastecimento, bica e rio). O desempenho analítico dessas metodologias foi comparado analisando-se 90 amostras de água. Nas contagens de coliformes totais em amostras de água provenientes de bica e de abastecimento e nas contagens de *E. coli* em amostras de água coletadas de abastecimento, bica e rio, as técnicas Colilert e Colitag mostraram resultados equivalentes aos da metodologia FTM. Nas análises de coliformes totais em amostras de água do rio, a técnica de FTM apresentou diferenças significativas quando comparada aos testes rápidos. Esta diferença pode ter ocorrido pela presença de *Aeromonas* nas amostras ou, possivelmente, pela maior capacidade das técnicas Colilert e Colitag em recuperar as células danificadas. Dessa forma, nos casos em que as técnicas rápidas forem equivalentes à metodologia convencional, dá-se preferência ao uso dos primeiros testes, por serem mais rápidos, práticos e de menor custo.

Palavras-chave. coliformes, *E. coli*, análise de água.

ABSTRACT

The total coliform and *E. coli* counts were performed using three methodologies (Multiple-Tube Fermentation - MTF, Colilert and Colitag) in water samples collected from three different points (water supply, spout and river). The performances of three methodologies were compared analyzing ninety water samples. In the analysis of total coliform of water samples from spout and supply and analysis of *E. coli* of water samples from supply, tap and river, Colilert and Colitag techniques were equivalent to MTF in counting these bacteria. However, for analyzing the total coliform in water samples collected from river, the MTF technique differed significantly from those rapid tests. This significant difference may be due to the presence of *Aeromonas* in water samples, or possibly because of the increased capacity of Colilert and Colitag techniques in recovering the injured cells. Thus, in event of the rapid technique were equivalent to conventional ones, the former should be used, as they are fast, practical and inexpensive.

Key words. coliforms, *E. coli*, water analysis.

INTRODUÇÃO

A água é o alimento mais consumido pela população e, por ser um importante veículo de transmissão de doenças, está associada a grandes riscos à saúde pública¹. Dentre as doenças comumente transmitidas pela água podem ser citadas: cólera, shigelose, leptospirose².

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% das doenças relatadas em países em desenvolvimento tem como veículo de transmissão a água de má qualidade¹. Uma vez tratada, a água deixa de ser um veículo de agentes patogênicos, garantindo a saúde pública.

Os microrganismos transmitidos pela água tem como principal rota de contaminação a fecal-oral, sendo disseminados na água a partir da contaminação desta com esgoto não tratado ou tratado inadequadamente². Assim, o controle da qualidade da água a ser consumida pela população é uma atividade de extrema importância.

A identificação de patógenos na água é possível, porém é uma prática difícil; sendo assim, é preferível realizar as análises de microrganismos indicadores de contaminação fecal, tais como as bactérias do grupo coliformes³. As bactérias deste grupo estão presentes no intestino humano e de animais de sangue quente, e são eliminadas em grandes quantidades nas fezes e quantificadas por métodos simples. Porém, neste grupo, há também bactérias de origem não exclusivamente fecal⁴.

A *E. coli* é uma bactéria pertencente ao grupo coliforme, que tem como habitat primário o intestino do homem e de animais de sangue quente, representando 95% das bactérias do grupo coliformes encontradas nas fezes humanas e de animais. Por ser uma bactéria de fácil isolamento e identificação em água e por seu período de sobrevivência ser semelhante ao dos patógenos mais comuns, a *E. coli* é considerada a melhor indicadora de contaminação fecal, sendo a tendência atual o uso da detecção específica de *E. coli*, e não mais de bactérias do grupo coliformes termotolerantes^{4,5}.

Dentre os métodos utilizados para a contagem de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água, se destacam o método convencional fermentação em tubos múltiplos (FTM) e os métodos rápidos Colilert e Colitag. O método FTM apresenta como desvantagem o fato de ser muito trabalhoso e demorado (até 96 horas). Já os métodos rápidos Colilert e Colitag se tornam vantajosos por utilizarem somente um meio e demorarem apenas 24 horas para darem o resultado da análise, possibilitando

ações corretivas, caso seja detectada a contaminação da água, impedindo o consumo de uma água possivelmente contaminada pela população.

Os métodos Colilert e Colitag são aprovados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), sendo o Colilert na década de 90 e o Colitag em 2004⁶, com o fim da patente da IDEXX sobre esta metodologia. Dessa forma, por ser mais novo, poucos trabalhos são encontrados na literatura envolvendo o método Colitag. O mecanismo de detecção de coliformes totais e *E. coli* desses métodos rápidos são os mesmos, assim como a metodologia utilizada.

Segundo os fabricantes do Colitag, esse produto promove a reativação e posterior detecção de *E. coli* danificadas pelo cloro. Esse método é confiável e de acordo com a USEPA gera 0,0% de resultados falso-negativos e 5,0% de resultados falso-positivos para coliformes totais e *E. coli*⁷.

No campo de pesquisa, o uso de métodos rápidos se torna vantajoso por diminuir o tempo de análise e, conseqüentemente, aumentarem a produtividade laboratorial.

O objetivo deste trabalho foi comparar a equivalência entre os métodos FTM, Colilert e Colitag na determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água provenientes de abastecimento, bica e rio.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram obtidas na cidade de Piracicaba – SP nos períodos de fevereiro/2009 a julho/2009. Foram coletadas amostras de três diferentes pontos, sendo 30 do abastecimento público municipal (SEMAE), captada em uma residência localizada no bairro Alto, 30 do rio Piracicamirim, na Avenida Professor Alberto Vollet Sachs e 30 de uma bica, localizada na Rua Silva Jardim, totalizando 90 amostras analisadas. As coletas foram realizadas segundo Silva et al⁴, e as amostras seguiram em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ/USP, em Piracicaba, onde foram prontamente analisadas.

A determinação do NMP de coliformes totais e *E. coli* pelos métodos FTM, Colilert e Colitag foi realizada de acordo com Hunt e Rice⁸.

A análise estatística foi feita pela análise de variância e aplicou-se o teste de Tukey, usando o sistema computacional SAS⁹.

RESULTADOS

Pela análise estatística exploratória foram encontrados alguns problemas, tais como escala, outliers (pontos discrepantes) e heterogeneidade de variâncias. Para resolver estes problemas, foi utilizado o método de transformação potência ótima de Box e Cox¹⁰, o qual sugeriu a transformação logarítmica na base 10 dos dados obtidos.

O resultado das análises dos dados obtidos para coliformes totais nos três pontos estudados pelos três métodos analisados, na escala transformada, mostraram uma interação entre pontos e métodos. Dessa forma, as médias de cada método foram estudadas dentro de cada ponto, e vice-versa, a partir do desdobramento da interação, conforme a Figura 1.

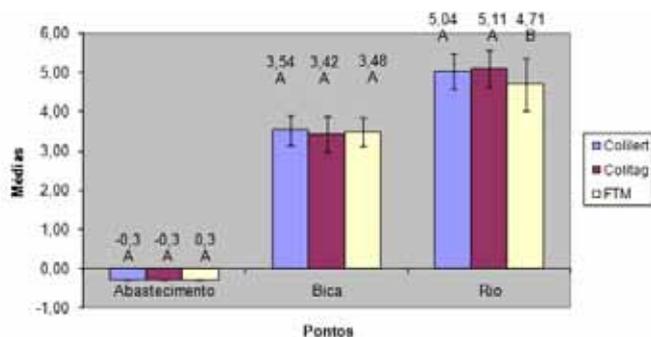


Figura 1. Contagens de coliformes totais em cada método dentro de cada ponto. Médias e comparações obtidas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra maiúscula em um mesmo ponto não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas amostras de água de abastecimento, não foram detectadas a presença de coliformes totais em nenhuma das 30 amostras; sendo assim, os métodos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Nas amostras de água da bica, a menor contagem foi encontrada pelo método Colitag e, a maior pelo método Colilert. O método FTM apresentou contagens intermediárias. Apesar disso, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos utilizados.

Nas amostras de água do rio, o método FTM apresentou a menor média e, o Colitag a maior. O método Colilert apresentou contagens intermediárias. Nesse caso, foi encontrada diferença significativa entre o método FTM e Colilert e entre FTM e Colitag.

Na análise estatística dos dados obtidos para a contagem de *E. coli*, não foi observada uma interação entre pontos e métodos. Dessa forma, a comparação das metodologias foi feita dentro de cada ponto.

Nas amostras de água de abastecimento, não foi detectada a presença de *E. coli* em nenhuma das 30 amostras. Assim, não foi encontrada diferença significativa entre os três métodos utilizados.

As médias obtidas a partir da transformação logarítmica dos dados para a contagem de *E. coli* em amostras de água da bica podem ser observadas na Figura 2.

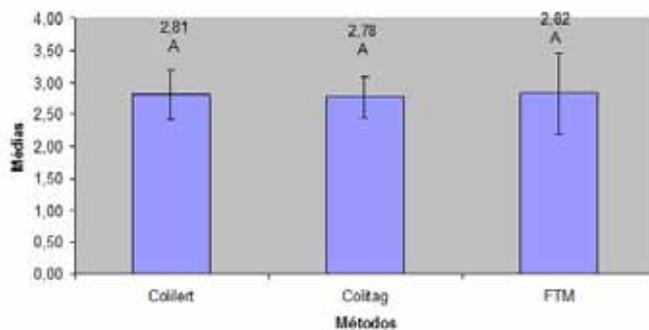


Figura 2. Médias das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água da bica. Médias encontradas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas amostras de água da bica, o método Colitag foi o que apresentou uma menor média. A maior média foi encontrada pelo método FTM, ficando o Colilert com contagens intermediárias. Apesar de tais diferenças, os métodos não diferiram entre si.

A Figura 3 mostra as médias encontradas a partir da transformação logarítmica das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água do rio.

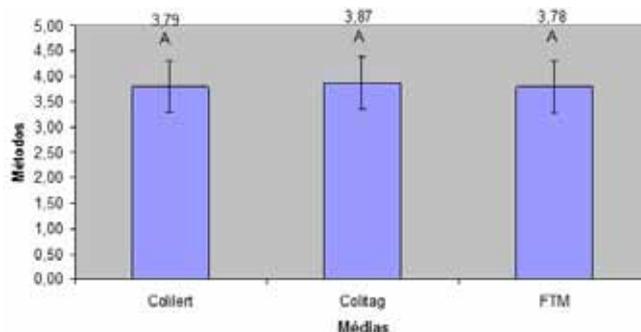


Figura 3. Médias das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água do rio. Médias encontradas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas análises de água do rio, o método FTM apresentou a menor contagem de *E. coli*. Já o método Colitag, a maior contagem, ficando o método Colilert com

contagens intermediárias. Apesar de tais diferenças entre as contagens, não foi observada diferença significativa entre os métodos.

DISCUSSÃO

Foi encontrada uma variação muito grande nos dados obtidos, o que era esperado pela natureza do substrato. Por ela ser pobre em nutrientes, as bactérias normalmente não se multiplicam na água, apenas sobrevivem e são veiculadas e, se apresentam heterogeneamente dispersas. Dessa forma, as alíquotas pipetadas podem ora conter e ora não conter as bactérias alvo.

A equivalência dos métodos rápidos e dos métodos convencionais tem sido muito estudada. Um estudo avaliou as condições higiênico-sanitárias da água tratada, coletadas nos pontos finais da rede de distribuição, pelos métodos Colilert e FTM. Foi observada a equivalência desses métodos na quantificação de coliformes totais e de *E. coli*, tanto nos resultados positivos quanto na ausência destas bactérias, destacando a rapidez e simplicidade do Colilert¹¹.

Outro estudo comparou os métodos da membrana filtrante, FTM, Colilert nas análises de água potável, e para recreação. Para as amostras de água potável observou-se que o método Colilert foi mais sensível na detecção de coliformes totais que os métodos convencionais utilizados (coeficiente de correlação 0,77). Para a detecção de *E. coli*, os três métodos apresentaram sensibilidades iguais (coeficiente de correlação 0,84). Apesar disso, os métodos se mostraram equivalentes, sendo o método Colilert considerado tão bom quanto, ou melhor que os métodos convencionais estudados. Nas amostras de água de recreação, o método Colilert apresentou sensibilidade igual a dos métodos convencionais na detecção de *E. coli*. Na detecção de coliformes totais, foram encontrados problemas na confirmação da presença destas bactérias em amostras analisadas pelo Colilert. Algumas delas apresentaram resultado ácido positivo, porém gás negativo, indicando a necessidade de novos estudos¹².

Em outro trabalho, foram comparadas as metodologias Colitag e FTM. O Colitag se mostrou tão sensível quanto o método convencional na detecção de coliformes em água de recreação, tanto em contagens altas como em baixas. Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos, destacando a rapidez do método Colitag¹³.

Na comparação dos métodos FTM com os métodos rápidos Colilert e ReadyCult em amostras de água

subterrânea, de superfície e tratada, foi observado que as técnicas que utilizam substratos definidos apresentaram uma alta sensibilidade e especificidade (>95%) na detecção de coliformes totais, e coeficiente kappa próximo de 1, indicando ótima concordância com o método FTM. Tanto a detecção de coliformes totais quanto de *E. coli* foi maior pelos métodos rápidos, devido à maior capacidade de recuperação e crescimento das células de coliformes desses métodos e por eles serem específicos para *E. coli*, enquanto que o método FTM não tem tal especificidade. Apesar destas observações, os métodos não apresentaram diferenças significativas entre si¹⁴.

No presente trabalho, também não foi observada uma diferença significativa entre os métodos rápidos Colilert e Colitag e o método convencional FTM nas contagens de coliformes totais em amostras de água de abastecimento e bica e na contagem de *E. coli* em amostras de água de abastecimento, bica e rio, concordando com a literatura pesquisada.

As contagens encontradas para coliformes totais em amostras de água do rio apresentaram uma diferença significativa ao nível de 5% de significância. Tal diferença pode ser resultado da presença de microrganismos não coliformes que geram resultados falso-positivos nos métodos rápidos, tais como *Aeromonas*. Esta bactéria pode apresentar uma pequena produção da enzima β -galactosidase, enzima presente nas bactérias do grupo coliforme e usada para a detecção destas nos métodos rápidos utilizados. Assim, quando a *Aeromonas* está presente em amostras de água, essa enzima pode reagir com o substrato cromogênico do meio (ONPG), resultando em uma coloração amarela. Tal cor, nesses métodos, é indicativa da presença de coliformes totais na amostra. Os métodos Colilert e Colitag apresentam, na formulação de seus meios, mecanismos para a inibição de *Aeromonas*, mas, nesse caso, tal inibição pode ter sido insuficiente.

A ocorrência de resultados falso-positivos também foi destacada em outros trabalhos. Na comparação entre dez metodologias que utilizam substratos definidos para a detecção de coliformes totais e *E. coli*, incluindo os métodos Colilert e Colitag, foram inoculadas, em amostras de água, duas diferentes cepas de *Aeromonas*, com a finalidade de comparar a capacidade dos métodos em inibir tais organismos. Foi encontrada uma grande variação nos resultados e uma diferença significativa entre os métodos na capacidade de inibição de microrganismos não coliformes capazes de gerar resultados falso-positivos, tais como *Aeromonas*.

De modo geral, o Colilert e o Colitag apresentaram uma capacidade de inibição de *Aeromonas* aceitável, mas apresentaram alguns resultados falso-positivos⁶.

Em outro estudo, foi feita a comparação entre os métodos Colilert e a técnica da membrana filtrante. Ocasionalmente o método Colilert obteve resultados falso-positivos em amostras contendo um alto nível de contaminação por *Aeromonas*¹⁵.

Outro fato que pode explicar a diferença significativa entre os métodos rápidos e o FTM é a capacidade de recuperação de células injuriadas, que normalmente é maior nos primeiros. Dessa forma, nas amostras de água do rio poderia haver um número grande de células bacterianas injuriadas que foram recuperadas e, conseqüentemente, detectadas pelos métodos Colilert e Colitag. Como a capacidade de recuperação pelo FTM normalmente é menor, estas células não foram detectadas por este método. Ainda, poderia ser considerado o fato da não produção da enzima lactose permease, a qual é responsável pela fermentação da lactose e produção de gás, que em células injuriadas pode não ser produzida no tempo de incubação recomendado pela metodologia, o que pode gerar falso-negativos na técnica FTM. A diferença na recuperação e detecção de células bacterianas do grupo coliforme injuriadas entre os métodos rápidos e os convencionais também foi destacada em outros estudos^{12,14,16, 17}.

De acordo com a literatura, o método Colitag tem como vantagem sobre o Colilert a sua capacidade de recuperação de células de *E. coli* danificadas pelo cloro. Porém, neste trabalho, tal vantagem não foi observada pela ausência dessa bactéria em amostras de água de abastecimento (clorada).

CONCLUSÃO

Em amostras de água de abastecimento e da bica, os métodos rápidos Colilert e Colitag se mostraram equivalentes ao método convencional FTM nas contagens de coliformes totais e *E. coli*.

Na análise de coliformes totais em amostras de água do rio, o método convencional FTM diferiu significativamente dos métodos rápidos Colilert e Colitag. Na comparação entre os métodos rápidos para esta mesma análise, não foi observada diferença significativa entre eles.

Na análise de *E. coli* em amostras de água do rio, ao contrário do observado para a análise de coliformes

totais, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos utilizados (FTM, Colilert e Colitag).

Por não apresentarem diferença significativa nas contagens de coliformes totais em amostras de água de abastecimento e de bica e nas análises de *E. coli*, em todos os tipos de amostras analisadas, é recomendado o uso dos métodos rápidos Colilert e Colitag como substituto do método convencional FTM. Tal substituição se faz vantajosa devido ao menor tempo necessário para a realização das análises (24 horas nos métodos rápidos e 96 horas no convencional), ao menor custo, não à necessidade da realização de testes confirmatórios e pelos métodos rápidos serem menos trabalhosos. Com a obtenção de resultado em um período de tempo menor, é possível evitar o uso de água contaminada pela população.

REFERÊNCIAS

1. Macedo JAB de. Águas e águas. 3ª ed. Belo Horizonte:CRQ-MG; 2007.
2. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008.
4. Silva N, Catanúsio Neto R, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica da água. São Paulo: Varela; 2005.
5. Jay JM. Microbiologia de alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
6. Olstadt J, Schauer JJ, Standridge J, Kluender S. A comparison of ten USEPA approved total coliform/*E. coli* tests. *J Water Health*. 2007;5(2):267-82.
7. BioAmerica. Colitag: Exatidão, Simplicidade e Segurança. [acesso 2010 Set 29]. Disponível em: [<http://www.grupos.com.br/group/engenhariadeaquicultura/Messages.html?action=download&year=07&month=9&id=1189445991709878&attach=>].
8. Hunt HE, Rice EW, coordinators. Microbiological examinations. In: Standard methods for the examination of water & wastewater, 21ª ed. Washington: APHA; 2005. Part 9000, p. 9-1 – 9-169.
9. SAS Institute. SAS/STAT User Guide: version 6.08. Carrey. 1997. v. 2.
10. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1964;26:211-46.
11. Cantusio Neto R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. *Hig Aliment*. 2001;15(90/91):64-7.

12. Eckner KF. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli* and Enterococci used in drinking water and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(8):3079-83.
13. Hsieh JJ. A comparison of the Multiple-tube fermentation method and Colitag method for the detection of waterborne coliform bacteria. [Acesso 2008 Jul 25]. Disponível em: [<http://socrates.berkeley.edu/~es196/projects/2001final/Hsieh.pdf>.]
14. Greggi S de 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 da fermentação em tubos múltiplos [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2005.
15. Cowburn JK, Goodall T, Fricker EJ, Walter KS, Fricker CR. A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring. *Lett Appl Microbiol*. 1994;19:50-2.
16. Fricker EJ, Illingworth KS, Fricker CR. Use of two formulations of Colilert and Quantitray for assessment of the bacteriological quality of water. *Water Res*. 1997;31(10):2495-9.
17. Chao KK, Chao CC, Chao WL. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(4):288-93.