



## COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Referente ao Relatório à Diretoria nº 005/2018/E, de 09/01/2018.

Relator: Eduardo Luís Serpa

### DECISÃO DE DIRETORIA Nº 011/2018/E, DE 16 DE JANEIRO DE 2018.

Dispõe sobre a homologação da revisão da Norma Técnica L5.202 – Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* – Determinação pela técnica de tubos múltiplos – janeiro de 2018.

A Diretoria Plena da CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, no uso de suas atribuições estatutárias e regulamentares, à vista de tudo quanto consta do Processo CETESB nº STA/0430/84 e considerando o contido no Relatório à Diretoria nº 005/2018/E, que acolhe, DECIDE:

Artigo 1º: Homologar a revisão da Norma Técnica L5.202 – Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* – Determinação pela técnica de tubos múltiplos – janeiro de 2018, cujo teor consta do Anexo Único que integra esta Decisão de Diretoria.

Artigo 2º: Esta Decisão de Diretoria entra em vigor na data de sua publicação.

Divulgue-se a todas as Unidades da Companhia, pelo sistema eletrônico.

Diretoria Plena da CETESB, em 16 de janeiro de 2018.

ORIGINAL  
DEVIDAMENTE  
ASSINADO

**CARLOS ROBERTO DOS SANTOS**

Diretor-Presidente

ORIGINAL  
DEVIDAMENTE  
ASSINADO

**WALDIR AGNELLO**

Diretor de Gestão Corporativa

ORIGINAL  
DEVIDAMENTE  
ASSINADO

**GERALDO DO AMARAL FILHO**

Diretor de Controle e Licenciamento Ambiental

ORIGINAL  
DEVIDAMENTE  
ASSINADO

**EDUARDO LUIS SERPA**

Diretor de Engenharia e Qualidade Ambiental

ORIGINAL  
DEVIDAMENTE  
ASSINADO

**GERALDO DO AMARAL FILHO**

Diretor de Avaliação de Impacto Ambiental  
em exercício



CETESB  
**NORMA TÉCNICA**

**L5.202**

5ª Edição  
Janeiro 2018  
29 páginas

## **Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* – Determinação pela técnica de tubos múltiplos**

### ***Title in English:***

*Total coliforms, thermotolerant coliforms and Escherichia coli – Procedure for multiple-tube technique*

### **Resumo**

Esta norma descreve os procedimentos para execução da técnica de tubos múltiplos, utilizada na estimativa da densidade de bactérias do grupo coliforme por número mais provável (NMP). A técnica descrita é empregada na avaliação da qualidade bacteriológica de amostras de água brutas ou tratadas destinadas ao consumo humano, recreação ou irrigação, bem como na avaliação da eficiência de processos de tratamento de águas e águas residuárias domésticas ou industriais e integridade dos sistemas de distribuição. As amostras podem ser avaliadas quanto à densidade de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*.

### **Palavras chave**

Coliformes totais  
Coliformes termotolerantes  
*Escherichia coli*  
Técnica de tubos múltiplos  
Número mais provável  
Análise da água

### **Key words**

Total coliforms  
Thermotolerant coliforms  
*Escherichia coli*  
Multiple-tube technique  
Most probable number  
Water analysis

### **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**

Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345  
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP  
Tel.: (11) 3133 3000 Fax: (11) 3133 3402 <http://www.cetesb.sp.gov.br>

© CETESB 2017

**Primeira Edição**

Janeiro/1978, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº 002/77- DDPET, de 02.01.1978

**Segunda Edição**

Novembro/1979, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº 166/79/DTD, de 07.11.1979

**Terceira Edição**

Julho/1985, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº 009/85/DENG, de 11.07.1985

**Quarta Edição**

Junho/1993, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº 025/93/N, de 14.06.1993

**Quinta Edição**

Janeiro/2018, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº /2018/E, de .01.2018

© CETESB 2017

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

**Sumário**

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Escopo</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Documentos complementares</b> .....	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Equipamentos</b> .....	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Meios de cultura e soluções</b> .....	<b>7</b>
<b>7</b>	<b>Execução do ensaio</b> .....	<b>13</b>
<b>8</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>21</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>29</b>
	<b>Anexo A</b> .....	<b>30</b>

**1 Introdução**

As águas de abastecimento apresentam o risco de serem poluídas por águas residuárias e excretas de origem humana ou animal, podendo, desta forma, conter organismos patogênicos, tornando-se, assim, um veículo na transmissão de doenças. Por isso, impõe-se a necessidade de exames rotineiros das mesmas, para determinar seu grau de segurança do ponto de vista bacteriológico.

Embora já existam métodos desenvolvidos para detecção de vários organismos patogênicos de veiculação hídrica, os mesmos não são aplicados na rotina laboratorial devido ao alto custo e necessidade de pessoal especializado. Além disso, uma vez que o lançamento de organismos patogênicos nos esgotos está na dependência das condições de saúde da população, é possível que, em determinadas ocasiões, não se detectem esses organismos na água, porém sua ausência não indica que a mesma seja segura.

Para a avaliação das condições sanitárias de uma água, utilizam-se bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de poluição fecal, pois estão sempre presentes no trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, sendo eliminadas em grandes números pelas fezes. A presença de coliformes na água indica poluição, com o risco potencial da presença de organismos patogênicos, e sua ausência é evidência de uma água bacteriologicamente potável, uma vez que são mais resistentes na água que as bactérias patogênicas de origem intestinal.

Como o grupo dos coliformes totais inclui gêneros que não são de origem exclusivamente fecal, isto limita sua aplicação como indicador específico de contaminação fecal. O reconhecimento deste fato levou ao desenvolvimento de métodos de enumeração de um subgrupo de coliformes denominados fecais (coliformes termotolerantes), os quais são diferenciados dos coliformes totais pela sua capacidade de fermentar a lactose em temperatura elevada (44,5°C).

Embora a utilização dos coliformes termotolerantes, em substituição aos totais, tenha determinado uma melhoria significativa na detecção da contaminação fecal, logo se tornou evidente a existência de outros coliformes termotolerantes (principalmente *Klebsiella*), os quais, por não serem de origem exclusivamente fecal, comprometiam a especificidade deste subgrupo para a finalidade proposta. Em decorrência disto, as tendências atuais se direcionam para a detecção específica de *E. coli*, que é o único componente do grupo coliforme de origem exclusivamente fecal.

## 2 Escopo

Esta Norma descreve o método de determinação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme utilizando a técnica dos tubos múltiplos. Tal metodologia deve ser aplicada no atendimento das seguintes demandas:

- a) avaliação e controle da qualidade bacteriológica de águas destinadas ao consumo humano (sem ou com desinfecção ou após tratamento convencional);
- b) controle de qualidade de águas brutas destinadas: à irrigação de hortaliças e plantas, à recreação de contato primário (natação, esqui-aquático, mergulho); à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana e à dessedentação de animais;
- c) avaliação da eficiência de processos de tratamento de águas e águas residuárias domésticas ou industriais; e avaliação da integridade dos sistemas de distribuição de água.

## 3 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma sugere-se consultar:

- APHA; AWWA; WEF. Quality assurance/quality control. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Part 9020. Approved by

Standard Methods Committee, 2015. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: dez. 2017.

- CETESB; ANA. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: set. 2017.

- USEPA. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**: criteria and procedures quality assurance. 5<sup>th</sup> ed. Cincinnati, OH, 2005. 209 p. + 2 supplements. (EPA 815-R-05-004). Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwlabcert/laboratory-certification-manual-drinking-water>>. Acesso em: set. 2017.

## 4 Equipamentos

Para execução dos procedimentos analíticos descritos nesta norma, são empregados os equipamentos listados a seguir.

### 4.1 Balanças

**Importante:** As balanças devem ser instaladas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura. Calibrações periódicas devem ser efetuadas, bem como verificações da balança com massas de referência.

#### 4.1.1 Balança de topo

É utilizada para pesar quantidades superiores ou iguais a 2 g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.

#### 4.1.2 Balança analítica

É utilizada para pesar quantidades inferiores a 2 g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo 1 mg ao serem pesados 10 g.

### 4.2 Banho-maria (44,5°C)

Equipamento com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme na faixa requerida ( $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) em todos os pontos. O nível de água no banho-maria deve ser mantido acima do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio imersos para incubação, sendo recomendada a troca semanal dessa água para evitar a proliferação de fungos e outros micro-organismos. O termômetro utilizado para o controle do banho-maria deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que  $0,1^\circ\text{C}$ .

### 4.3 Destilador ou purificador de água

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA, 2005).

#### **4.4 Autoclave**

Deve ter a capacidade suficiente para permitir a circulação de vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.

As autoclaves mais modernas possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão. Elas também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo.

#### **4.5 Estufa para esterilização**

Deve manter a temperatura de  $170 \pm 10^\circ\text{C}$  durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que  $10^\circ\text{C}$ , com o seu bulbo ou sensor colocado na areia, durante o uso.

#### **4.6 Incubadora bacteriológica (35°C)**

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que  $0,5^\circ\text{C}$  e estar imerso em líquido.

#### **4.7 Incubadora do tipo Jaqueta d' água (44,5°C)**

Deve manter a temperatura na faixa requerida de  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Esta faixa de temperatura é obtida por meio da circulação de água aquecida ao redor de uma câmara externa, o que mantém a temperatura no interior da incubadora constante. O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que  $0,1^\circ\text{C}$  e estar imerso em líquido.

#### **4.8 Potenciômetro**

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua padronização deve ser feita antes de cada período de uso com duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0; pH = 6,86 ou = 9,18) de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada.

#### **4.9 Refrigerador**

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a  $8^\circ\text{C}$  e ter capacidade para armazenar meios de cultura, reagentes, soluções ou amostras que necessitam de refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que  $1^\circ\text{C}$  e estar imerso em líquido.

### **5 Materiais**

Para execução dos procedimentos analíticos descritos nesta norma, são empregados os materiais listados a seguir.

#### **5.1 Balões**

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para preparo de meios de cultura.

## **5.2 Frasco para água de diluição**

De borossilicato ou vidro neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

## **5.3 Frasco para coleta de amostra**

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

## **5.4 Pipetas**

Tipo Mohr, para 10 mL e 5 mL com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis de plástico, estéreis, ou de vidro borossilicato neutro.

## **5.5 Tubos de Durham**

De borossilicato ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro de tudo de ensaio serão utilizados. Usualmente são empregados tubos de Durham de 7 mm x 4,5 mm e de 5 mm x 4 mm.

## **5.6 Tubos de ensaio**

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o meio de cultura e a amostra, sem atingir mais de três quartos da capacidade completa. Recomenda-se que as tampas dos tubos sejam de aço inoxidável, plástico, alumínio ou de rosca com batoques não tóxicos. Não se recomenda a utilização de tampões de algodão ou espuma. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm e de 12 mm x 120 mm.

## **5.7 Alças de inoculação**

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7 a 8 cm de comprimento, com um aro de 3 mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle). Também podem ser utilizadas alças plásticas descartáveis e pré-esterilizadas.

Alternativamente, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. Antes do uso, estas hastes são esterilizadas por calor seco ( $170 \pm 10^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas. Após o uso as mesmas são autoclavadas a  $121^\circ\text{C}$  durante 30 minutos e descartadas.

## **5.8 Bico de Bunsen ou similar**

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

## **5.9 Caixas ou cestas de aço inoxidável**

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

## **5.10 Estantes**

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

### 5.11 Placas de Petri

De vidro borossilicato neutro, com 15 mm de altura e 100 mm de diâmetro ou de plástico não tóxico, com 15 mm de altura e 90 mm de diâmetro, estéreis.

### 5.12 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro borossilicato neutro ou aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

### 5.13 Termômetros

Os termômetros de vidro devem ter escala adequada ao uso (faixa de medição e graduação) e a coluna de líquido não deve apresentar interrupções. Os termômetros eletrônicos digitais devem apresentar faixa de medição, resolução, exatidão e precisão adequadas ao uso. Todos os termômetros devem ser calibrados periodicamente e a correção da temperatura deve ser efetuada, quando aplicável.

**Importante:** Não se recomenda a utilização de termômetros de vidro contendo mercúrio.

### 5.14 Lâmpada ultravioleta

Lâmpada de luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 - 366nm e 6 watts de potência.

## 6 Meios de cultura e soluções

A seguir são descritas as fórmulas dos meios de cultura e soluções, bem como os modos de preparo, formas de armazenamento e prazos de validade.

Para o preparo dos meios de cultura e soluções devem ser usados meios desidratados e reagentes de qualidade comprovada. Deve-se evitar o aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e a esterilização não deve exceder duas horas.

### 6.1 Caldo lauril triptose com púrpura de bromocresol – CLT (concentração dupla)

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

a) fórmula:

Triptose .....	40,0 g
Lactose .....	10,0 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	5,5 g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ). ....	5,5 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10,0 g
Lauril sulfato de sódio .....	0,2 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 6,8 ± 0,2	



b) preparo:

Pesar 0,02 g de púrpura de bromocresol e acrescentar 20 mL de água purificada. Aquecer, agitando até a completa dissolução e reservar essa solução. Pesar o meio desidratado Caldo lauril triptose no dobro da quantidade especificada no frasco e acrescentar 980 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Adicionar a solução de púrpura de bromocresol preparada e misturar por agitação. Distribuir em tubos de ensaio de tampa frouxa ou de rosca de 18 mm x 180 mm, contendo em seu interior um tubo de fermentação invertido de 7 mm x 45 mm, volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Fechar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo duas semanas para os tubos com tampa frouxa e três meses para os tubos com tampa de rosca.

## 6.2 Caldo lauril triptose com púrpura de bromocresol – CLT (concentração simples)

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

a) fórmula:

Triptose .....	20,0 g
Lactose .....	5,00 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	2,75 g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	2,75 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,00 g
Lauril-sulfato de sódio .....	0,10 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 6,8 ± 0,2	

b) preparo:

Pesar 0,01 g de púrpura de bromocresol e acrescentar 10 mL de água purificada. Aquecer, agitando até a completa dissolução e reservar essa solução. Pesar o meio desidratado Caldo lauril triptose na quantidade especificada no frasco e acrescentar 990 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Adicionar a solução de púrpura de bromocresol preparada e misturar por agitação. Distribuir em tubos de ensaio de tampa frouxa de 16 mm x 150 mm ou de rosca de 15 mm x 150 mm, contendo em seu interior um tubo de fermentação invertido de 7 mm x 45 mm, volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Fechar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas para os tubos com tampa frouxa e três meses para os tubos com tampa de rosca.

### 6.3 Caldo Lactosado com verde brilhante e bile a 2% (CLVBB)

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

a) fórmula:

Peptona.....	10,0 g
Lactose .....	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	20,0 g
Verde brilhante.....	0,0133 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$	

b) preparo:

Pesar o meio desidratado Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1000 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir em tubos de ensaio de tampa frouxa de 16 mm x 150 mm ou de rosca de 15 mm x 150 mm, contendo em seu interior um tubo de fermentação invertido de 7 mm x 45 mm, volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Fechar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas para os tubos com tampa frouxa e três meses para os tubos com tampa de rosca.

### 6.4 Caldo EC

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

a) fórmula:

Triptose ou tripticase.....	20,0 g
Lactose .....	5,0 g
Mistura de sais biliares.....	1,5 g
Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ).....	4,0 g
Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ).....	1,5 g
Cloreto de Sódio (NaCl) .....	5,0 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$	

b) preparo:

Pesar o meio EC desidratado na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1000 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio tampa frouxa de 12 mm x 120 mm, contendo em seu interior um tubo de fermentação invertido de 5 mm x 40 mm. Fechar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

## c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas.

**6.5 Caldo EC com MUG**

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

## a) fórmula:

Triptose ou tripticase .....	20,0 g
Lactose .....	5,0 g
Mistura de sais biliares .....	1,5 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	4,0 g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ). .....	1,5 g
Cloreto de Sódio (NaCl) .....	5,0 g
4-Metilumbeliferil-β-D-glicuronideo (MUG) .....	0,05 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2	

## b) preparo:

Pesar o meio EC MUG desidratado na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1000 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio tampa frouxa de 16 mm x 150 mm ou de rosca de 15 mm x 150 mm. Fechar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

**Importante:**

- Os tubos utilizados para distribuição não devem ser autofluorescentes sob luz ultravioleta de 365 -366 nm.

- Não é necessário colocar o tubo de fermentação invertido.

## c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas para os tubos com tampa frouxa e três meses para os tubos com tampa de rosca.

**6.6 Ágar m-Endo LES**

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

## a) fórmula:

Extrato de levedura .....	1,2 g
Casitona ou Tripticase.....	3,7 g
Tiopeptona ou tiotona.....	3,7 g
Triptose .....	7,5 g
Lactose .....	9,4 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	3,3 g

Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	1,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl) .....	3,7 g
Desoxicolato de sódio .....	0,1 g
Lauril sulfato de sódio .....	0,05 g
Sulfito de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) .....	1,6 g
Fucsina básica .....	0,8 g
Ágar .....	15 g
Água purificada (contendo 20 mL de álcool etílico 95%) .....	1000 mL
pH final após esterilização: 7,2 ± 0,2	

## b) preparo:

Pesar o meio desidratado Ágar m-Endo LES na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1000 mL de água purificada contendo 20 mL de álcool etílico 95%. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esfriar até uma temperatura entre 45 e 50°C. Não esterilizar em autoclave. Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm ou 15 mm x 90 mm.

## c) armazenamento:

O meio preparado deverá ser armazenado em refrigerador (2 a 8°C), ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas.

## 6.7 Ágar nutriente

Este meio deve ser preparado e armazenado como segue:

## a) fórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Ágar .....	15,0 g
Água purificada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 6,8 ± 0,2	

## b) preparo:

Pesar o meio desidratado Ágar nutriente na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1000 mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 8 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio ainda estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

## c) armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura inferior a 30°C, em local limpo, durante, no máximo, três meses (tampa de rosca).

## 6.8 Água de diluição

Esta solução deve ser preparada e armazenada como segue:

a) fórmula:

Solução-estoque A .....	1,25 mL
Solução-estoque B .....	5,00 mL
Água purificada .....	1000 mL

b) preparo:

- preparar a solução-estoque A com seguinte composição:

Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	34,0 g
Água purificada .....	1000 mL

Preparo: Pesar o fosfato monopotássico e colocar em um balão volumétrico. Acrescentar 500 mL de água purificada e homogeneizar até a completa dissolução do sal, ajustar o pH para  $7,2 \pm 0,5$  com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um 1000 mL com água purificada. Colocar em frasco com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira ( $2$  a  $8^\circ\text{C}$ ).

**Importante:** Descartar a solução se ocorrer desenvolvimento de turbidez.

- Preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) .....	81,1 g
Água purificada .....	1000 mL

Preparo: Pesar o cloreto de magnésio e colocar em um balão volumétrico. Acrescentar 500 mL de água purificada e homogeneizar até a completa dissolução do sal. Completar o volume para 1000 mL com água purificada. Colocar em frasco com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira ( $2$  a  $8^\circ\text{C}$ ).

**Importante:** Descartar a solução se ocorrer desenvolvimento de turbidez.

- Preparar a solução de uso:

Preparo: Adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a 1000 mL de água purificada. Distribuir, em frascos de diluição com tampa de rosca, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de  $90 \pm 2$  mL. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos.

pH final após esterilização:  $7,2 \pm 0,1$

c) armazenamento:

A água de diluição preparada poderá ser estocada à temperatura inferior a  $30^\circ\text{C}$ , em local limpo, durante, no máximo, duas semanas.

## 6.9 Solução de hidróxido de sódio 1N

Esta solução deve ser preparada e armazenada como segue:

a) fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) .....	40,0 g
Água purificada .....	1000 mL

b) preparo:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) e dissolver em 1000 mL de água purificada. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

c) armazenamento:

Armazenar a temperatura ambiente por um período de 6 meses.

## 6.10 Soluções para a coloração de Gram

Estas soluções devem ser preparadas como segue:

- a) solução de cristal violeta – preparo: Dissolver 2,0 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico 95%. Dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água purificada. Misturar estas soluções e deixar em repouso por 24 horas antes do uso. Filtrar através de papel de filtro em um frasco âmbar ou protegido da luz com tampa rosqueada.
- b) solução de lugol – preparo: Colocar 2,0 g de iodeto de potássio (KI) e 1,0 g de cristais de iodo em um almofariz e acrescentar aos poucos cerca de 5 mL de água purificada, triturando até a completa dissolução dos cristais. Enxaguar e transferir para um frasco âmbar ou protegido da luz com tampa de rosca, adicionando água purificada até completar o volume de 300 mL.
- c) solução de safranina – preparo: Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico 95%, preparando-se, assim, a solução-estoque de safranina. No momento do uso, diluir 10 mL dessa solução-estoque em 100 mL de água purificada.
- d) solução de álcool-acetona – preparo: Misturar volumes iguais de álcool etílico 95% e acetona.

## 7 Execução do ensaio

Para execução do ensaio, seguir os procedimentos descritos:

### 7.1 Princípio do método

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes em uma amostra é efetuada a partir de aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas, uniformemente distribuídas na amostra. A técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Por meio de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos, cuja sementeira fornece resultados negativos em pelo menos um tubo da série em que os mesmos foram inoculados; e a combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa de densidade das bactérias pesquisadas pela aplicação de cálculos de probabilidade. Para análise de água, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, usando-se séries de 5 tubos para cada volume a ser inoculado.

## 7.2 Etapas do método

O exame para determinação de coliformes totais se processa por meio de 2 etapas (ensaios presuntivo e confirmativo), de realização obrigatória para todos os tipos de amostras de água, as quais são complementadas, quando indicado, por uma terceira etapa (exame completo). A densidade de coliformes termotolerantes ou *E. coli* é obtida a partir de um exame específico, aplicado paralelamente ao teste para confirmação de coliformes totais.

### 7.2.1 Ensaio presuntivo

Consiste na semeadura de volumes determinados da amostra em séries de tubos de Caldo lauril triptose (CLT) com púrpura de bromocresol que são incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , durante 24-48 horas, ocorrendo um enriquecimento de organismos fermentadores da lactose. A acidificação, com ou sem produção de gás, decorrente da fermentação da lactose contida no meio de cultura empregado nesse ensaio é prova presuntiva positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme.

### 7.2.2 Ensaio confirmativo

Consiste na transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo (produção de ácido com ou sem gás em CLT com púrpura de bromocresol após 24 ou 48 horas a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) para Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (CLVBB), sendo a incubação efetuada também a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , durante 48 horas. A produção de gás a partir da fermentação da lactose neste meio é prova confirmativa positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme. Esta etapa do exame reduz a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-positivos, decorrentes da atividade de bactérias esporuladas e de bactérias Gram-positivas fermentadoras da lactose.

### 7.2.3 Ensaio para diferenciação de coliformes termotolerantes ou *E. coli*

Consiste na transferência de inóculo de cada cultura com resultado positivo em CLT com púrpura de bromocresol para tubos contendo meio EC (coliformes termotolerantes) ou EC MUG (*E. coli*), que serão incubados durante  $24 \pm 2$  horas em banho-maria ou incubadora a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . O resultado para coliformes termotolerantes será positivo quando houver produção de gás a partir da fermentação da lactose contida no meio E.C ou para *E. coli*, quando houver fluorescência azul sob lâmpada ultravioleta de comprimento de onda 365 - 366 nm em ambiente escuro.

### 7.2.4 Ensaio completo

O ensaio completo inclui, além da realização dos ensaios presuntivo e confirmativo, o isolamento das culturas de bactérias com resultado positivo no CLVBB em placas de Ágar m-Endo LES, para a realização de testes posteriores. Colônias típicas (coloração rosa a vermelho escuro com brilho verde metálico na superfície) isoladas em Ágar m-Endo LES são transferidas para Caldo lauril triptose e para Ágar nutriente, sendo o crescimento bacteriano neste último meio empregado para a realização da coloração de Gram. O resultado do teste completo será positivo quando houver produção de gás a partir da fermentação da lactose em Caldo lauril triptose e for demonstrada, por exame microscópico, a presença de bacilos Gram-negativos, não esporulados, nos esfregaços submetidos à coloração de Gram. A realização do teste completo tem por finalidade eliminar os resultados falsos-positivos que podem ocorrer no CLVBB, devido à ação sinérgica de bactérias.

## 7.3 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia nacional de coleta e preservação de amostras de água (CETESB; ANA, 2011).

## 7.4 Procedimento

Proceder conforme descrito a seguir:

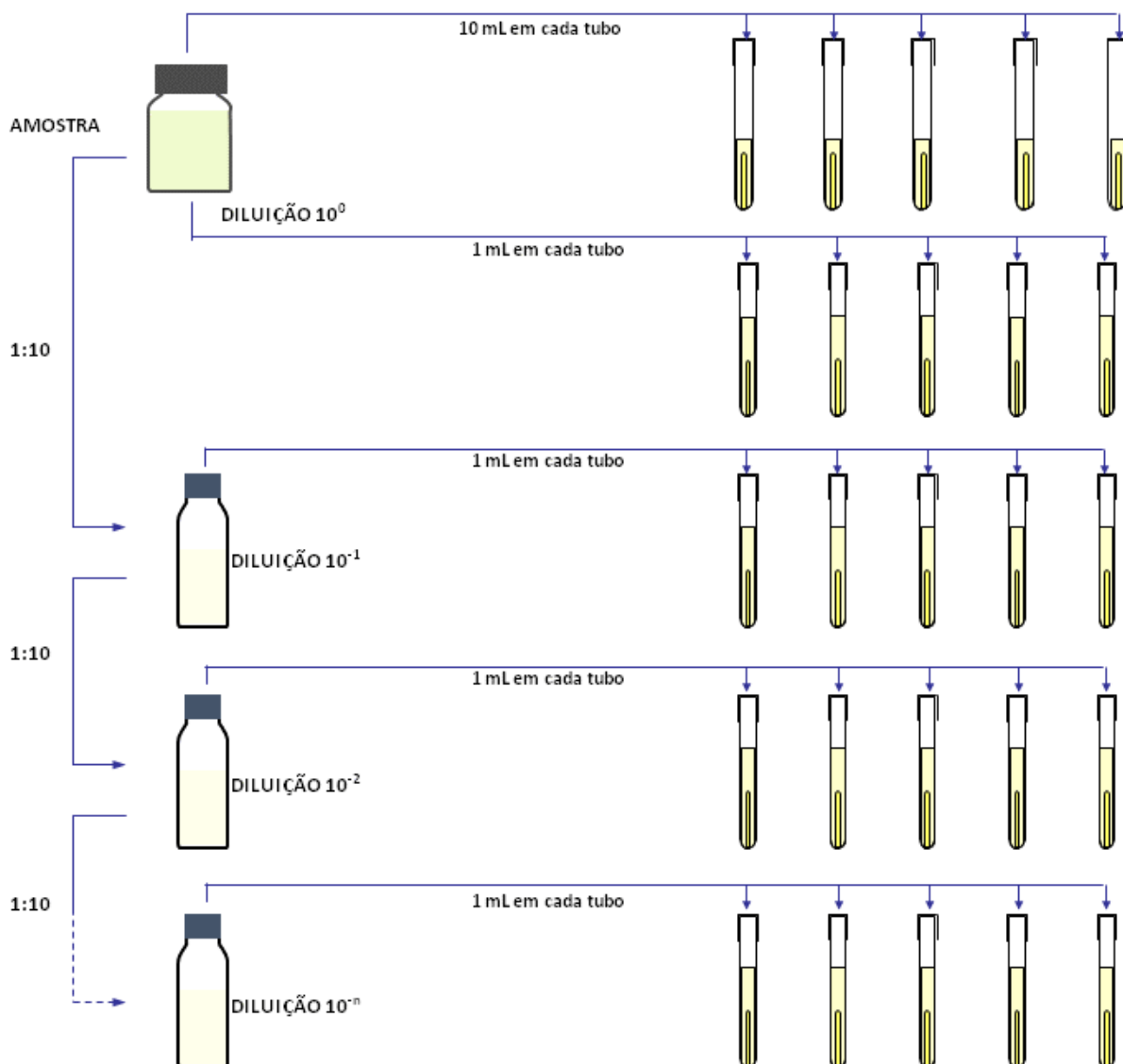
- a) identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes da mesma a serem inoculados, em função de sua procedência, segundo especificações a seguir:
  - Para águas destinadas ao consumo humano, é requerida, preferencialmente, a inoculação de 10 porções de 10 mL; entretanto, quando isso não for possível, é permitida a análise de 5 porções de 20 mL.
  - Para outros tipos de águas, a técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, sendo cada volume inoculado em uma série de 5 tubos. A seleção desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de coliformes presentes na amostra ou em dados prévios sobre a mesma), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado com o menor volume selecionado forneça resultado negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável, para amostra desconhecidas, a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.
- b) antes de iniciar a análise, desinfetar a bancada de trabalho usando um desinfetante álcool etílico 70%.
- c) realizar o ensaio presuntivo, conforme especificado nas alíneas d a t.
- d) preparar os tubos de CLT com púrpura de bromocresol, requeridos para o ensaio conforme definido na alínea a e dispô-los em estantes, em fileiras de 5 tubos.

**Importante:** Usar CLT com púrpura de bromocresol em concentração dupla para a inoculação das porções de 10 mL da amostra e, em concentração simples, para os demais volumes.
- e) proceder à identificação dos tubos, anotando, no primeiro tubo à direita na primeira fileira, o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado em cada um dos tubos das mesmas.
- f) homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de, aproximadamente, 45° entre o braço e o antebraço.
- g) com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, antecipadamente identificado. Prepara-se, assim, a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra.
- h) com a mesma pipeta, semear 10 mL da amostra em cada um dos tubos de CLT com púrpura de bromocresol em concentração dupla, quando este volume for requerido para o teste (**Fig. 1**).
- i) desprezar a pipeta de 10 mL e, com uma pipeta de 5 mL, inocular 1 mL da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo.



- j) homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), conforme descrito na alínea f e, com uma nova pipeta estéril, transferir 10 mL para um frasco contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,01 mL da amostra.
- k) proceder dessa maneira na sequência de diluições desejadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ... $10^{-n}$ ).
- l) ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo a sequência crescente das mesmas (da menor para a maior diluição efetuada).
- m) agitar vigorosamente, 25 vezes, o frasco com a primeira diluição efetuada ( $10^{-1}$ ) e, com uma pipeta estéril de 5 mL, inocular 1 mL da diluição em cada um dos tubos de CLT com púrpura de bromocresol em concentração simples, correspondentes a essa diluição.
- n) proceder da mesma maneira com a próxima diluição utilizando uma nova pipeta estéril.

**Observação:** A **Figura 1** sumariza o procedimento relativo à inoculação dos volumes da amostra e das suas diluições decimais.

**Figura 1 – Ensaio presuntivo – Inoculação dos volumes da amostra e suas diluições decimais**

Fonte: CETESB (2017)

- o) após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o ensaio, colocar a estante, contendo os tubos inoculados, em incubadora a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , durante  $24 \pm 2$  horas.
- p) após esse período de incubação, retirar a estante com os tubos da incubadora, para efetuar a leitura dos resultados. Para isso, agitar delicadamente cada tubo e examiná-lo quando à acidificação do meio (evidenciada pela coloração amarela do mesmo) e produção de gás nos tubos de fermentação.
- q) transferir, para outra estante, os tubos com resultados positivos (acidificação do meio e/ou produção de gás), mantendo em fileiras sequenciais os tubos positivos correspondentes a cada volume inoculado.

**Importante:** Essas culturas com resultados presuntivos positivos são encaminhadas ao ensaio para confirmação de coliformes totais (alínea u) imediatamente após a leitura dos resultados.

- r) registrar os resultados, anotando o número de tubos com resultados positivo para cada volume inoculado.
- s) retornar à incubadora a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  os tubos com resultados negativos, por um período adicional de  $24 \pm 1$  horas.
- t) após esse período, efetuar a segunda leitura ( $48 \pm 3$  horas), segundo descrito na alínea p, separando os tubos com resultados positivos (conforme especificado na alínea q), para realização dos ensaios de confirmação de coliformes totais e para diferenciação de coliformes termotolerantes ou *E. coli*, descartando, agora, os tubos com resultados negativos.
- u) com todas as culturas, que apresentarem resultado presuntivo positivo em  $24 \pm 2$  horas e  $48 \pm 3$  horas, realizar o **ensaio confirmativo** conforme descrito nas alíneas v a y, imediatamente após as respectivas leituras.
- v) marcar tubos de CLVBB correspondentes, respectivamente, a cada tubo de CLT, com resultado presuntivo positivo (acidificação e/ ou produção de gás).
- w) agitar bem cada tubo de CLT com púrpura de bromocresol com resultado presuntivo positivo e, com uma alça de inoculação ou haste de madeira estéril, retirar o material e inocular no tubo de CLVBB correspondente, evitando a película superficial que pode se formar no meio presuntivo positivo.
- x) incubar todos os tubos de CLVBB inoculados, durante  $48 \pm 3$  horas a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
- y) efetuar a leitura após  $48 \pm 3$  horas, considerando teste confirmativo positivo para coliformes totais todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de fermentação invertido. Anotar os resultados e calcular o NMP a partir dos dados obtidos.
- z) paralelamente à realização do ensaio para confirmação de coliformes totais, efetuar o ensaio para diferenciação de coliformes termotolerantes ou *E. coli* (conforme descrito em aa a ff) com todas as culturas que apresentarem resultados presuntivo positivo em  $24 \pm 2$  horas e  $48 \pm 3$  horas.
- aa) efetuar a marcação de tubos de EC (para coliformes termotolerantes) ou EC MUG (para *E. coli*) com os números correspondentes a cada tubo de meio presuntivo (CLT com púrpura de bromocresol) em que se verificou acidificação, com ou sem formação de gás.
- bb) agitar bem cada tubo positivo de CLT com púrpura de bromocresol e, com uma alça de inoculação ou haste de madeira estéril, colher um inóculo da cultura e transferi-lo para o tubo de EC ou EC MUG correspondente, evitando a película superficial que pode se formar na cultura presuntivo positiva.
- cc) incubar todos os tubos de EC ou EC MUG inoculados, no máximo até 30 minutos após a inoculação, em banho-maria a  $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas.
- dd) efetuar a leitura nos tubos de EC, considerando, como resultado positivo para coliformes termotolerantes, todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de fermentação.

ee) efetuar a leitura nos tubos de EC MUG, considerando, como resultado positivo para *Escherichia coli*, todos os tubos que apresentarem fluorescência azul sob luz UV de 365 – 366 nm em ambiente escuro.

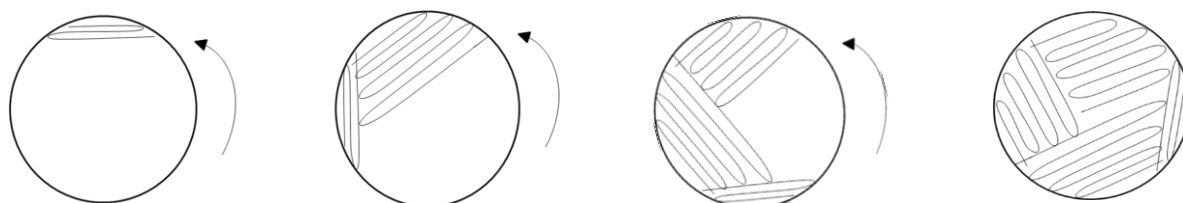
ff) com os dados obtidos, calcular o NMP de coliformes termotolerantes ou *E. coli*.

## 7.5. Ensaio completo

A seguir são descritos os procedimentos para aplicação do ensaio completo:

### Importante:

- A aplicação do ensaio completo é recomendada especificamente para amostras de águas destinadas ao consumo humano (tratadas ou brutas), para comprovar definitivamente a ocorrência de coliformes totais, visto que a presença destas bactérias na água pode impugnar sua utilização para essa finalidade.
- Este teste é recomendado também como um procedimento de controle de qualidade analítica para amostras não potáveis, devendo ser aplicado em 10% das amostras analisadas que apresentaram resultados positivos no ensaio confirmativo.
- As culturas que apresentaram resultados positivos tanto no CLVBB como no meio EC ou EC MUG não requerem a aplicação deste teste.
- A coloração de Gram não é de realização obrigatória no exame completo para amostras de águas potáveis, visto não ser frequente, nesse tipo de água, a ocorrência de bactérias gram-positivas e organismos formadores de esporos que conseguem sobreviver ao procedimento seletivo de triagem.
  - a) se a finalidade do exame for o ensaio completo, prosseguir apenas com as culturas com resultado positivo em CLVBB e que apresentaram resultado negativo no meio EC ou EC MUG.
  - b) identificar placas de Ágar m-Endo LES, correspondendo, cada uma, a um tubo de CLVBB com resultados positivo.
  - c) flambar e resfriar uma alça de inoculação de platina ou níquel-cromo, com um aro de 3 mm de diâmetro em sua extremidade.
  - d) agitar e inclinar o tubo de CLVBB e mergulhar a extremidade da alça de inoculação no líquido do tubo a uma profundidade de, aproximadamente, 1 cm, para colher um inóculo da cultura.
  - e) depositar o inóculo em um ponto na placa de Ágar m-Endo LES, girá-la e iniciar seu espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando danificá-lo. Girar novamente a placa e continuar o espalhamento no 2º quadrante. Proceder dessa maneira até completar a semeadura em toda a superfície do ágar (**Figura 2**).

**Figura 2 – Semeadura por estriamento em placa de Petri**

Fonte: Adaptado de CETESB (1993, p. 24).

- f) após incubação a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas, efetuar a leitura, considerando como típicas de coliformes as colônias de coloração rosa a vermelho escura, com brilho verde metálico na superfície; considerar como colônias atípicas de coliformes as colônias róseas, vermelhas, brancas ou incolores, sem brilho verde metálico.
- g) selecionar de cada placa, 1 ou mais colônias típicas de coliformes isoladas ou, se não houver colônias típicas, escolher 2 ou mais colônias mais semelhantes às colônias de coliformes, e semear, com auxílio de uma alça de inoculação, cada uma delas em um tubo de Caldo lauril triptose com tubo de fermentação invertido e em um tubo de Ágar nutriente inclinado.
- h) incubar o Caldo lauril triptose durante 24-48 horas e o Ágar nutriente inclinado durante 18-24 horas, ambos a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
- i) a partir das culturas em Ágar nutriente inclinado, correspondentes a colônias que apresentaram resultado positivo no Caldo lauril triptose (produção de gás), preparar o esfregaço para a coloração de Gram.
- j) preparação de esfregaço:
- limpar bem uma lâmina de vidro, para livrá-la de qualquer traço de película oleosa;
  - colocar uma gota de água destilada sobre a lâmina;
  - com uma alça de inoculação, colher uma pequena quantidade de crescimento bacteriano na superfície do Ágar nutriente inclinado e suspendê-la na gota de água destilada;
  - com a ponta de alça de inoculação, espalhar sobre a lâmina de modo a formar uma película bem fina;
  - fixar o esfregaço, passando a lâmina 3 vezes sobre uma chama.
- k) coloração de Gram:
- cobrir o esfregaço durante 1 minuto com solução de cristal violeta;
  - remover o excesso da solução de cristal violeta da lâmina, lavando-a levemente com água corrente
  - cobrir o esfregaço com solução de lugol durante 1 minuto;
  - decorar o esfregaço, usando uma solução de álcool-acetona (1:1);
  - cobrir o esfregaço, durante 15 segundos, com solução de safranina, diluída segundo item 6.10, alínea c.
  - lavar a lâmina em água corrente em água corrente e enxugá-la delicadamente com papel filtro, pela leve compressão do mesmo sobre a lâmina.

l) examinar as lâminas ao microscópio, usando objetiva de imersão. As bactérias coliformes são bacilos não esporulados, gram-negativos (corados em rosa) e podem aparecer aos pares ou raramente em pequenas cadeiras.

m) para cada tubo de CLVBB submetido ao teste completo, é considerado resultado positivo para a presença de coliformes neste teste, se pelo menos uma das colônias isoladas no Ágar m-Endo LES apresentar gás no Caldo lauril triptose e for demonstrada a presença de bacilos Gram-negativos não esporulados na coloração de Gram correspondente. Para o cálculo do NMP, considerar o nº de tubos CLVBB, cuja positividade foi comprovada pelos resultados do teste completo.

**Observação:** O esquema do procedimento completo é apresentado no **Anexo A**.

## 8 Resultados

A densidade de coliformes é expressa como NMP de coliformes por 100 mL, utilizando-se tabelas, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

### 8.1 Cálculo do número mais provável (NMP/100mL)

A seguir são apresentadas as tabelas para cálculo do número mais provável para diferentes tipos de ensaio.

#### 8.1.1 NMP para 5 porções de 20mL da amostra

A **tabela 1** fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 5 porções de 20 mL da amostra.

**Tabela 1 – Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas 5 porções de 20 mL da amostra**

Número de tubos com reação positiva, a partir de 5 tubos de 20 mL	Índice de NMP 100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	-	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,40	8,4
3	4,6	1,0	13
4	8,0	2,1	23
5	> 8,0	3,4	-

Fonte: APHA, AWWA e WEF (c2017, p. 5).

#### 8.1.2 NMP para 10 porções de 10mL da amostra

A **tabela 2** fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 10 porções de 10 mL da amostra.

**Tabela 2 – Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas 10 porções de 10 mL da amostra**

Número de tubos com reação positiva, a partir de 10 tubos de 10 mL	Índice de NMP 100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	-	3,4
1	1,1	0,051	5,9
2	2,2	0,37	8,2
3	3,6	0,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	6,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12	4,8	24
8	16	5,8	34
9	23	8,1	53
10	> 23	13	-

Fonte: APHA, AWWA e WEF (c2017, p. 5).

### 8.1.3 NMP para 5 porções de 10mL, 5 porções de 1mL e 5 porções de 0,1mL da amostra

A **tabela 3** apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas 5 porções de 10 mL, 5 porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL da amostra. Embora os volumes indicados se refiram mais especificamente a amostras de águas pouco poluídas, esta tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de coliformes totais, o código é composto a partir dos tubos com resultado positivo no meio CLVBB (ensaio confirmativo) ou, no caso de ter sido efetuado o exame completo, a partir do número de tubos de CLVBB, em relação aos quais a positividade dos resultados foi confirmada pelos testes adicionais (coloração de Gram negativa e produção de gás em Caldo Lauril Triptose pelas colônias isoladas de cada tubo de CLVBB com resultado positivo no ensaio confirmativo). Para a determinação do NMP de coliforme termotolerantes ou *E. coli*, o código é composto a partir dos resultados obtidos no meio EC ou EC MUG respectivamente.

**Tabela 3 – Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1mL e 0,1mL em séries de 5 tubos**

(continua)

Número de tubos com reação positiva quando utilizados, em séries de 5 tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100 mL	Limite de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	<1,8	-	6,8
0	0	1	1,8	0,090	6,8
0	1	0	1,8	0,090	6,9
0	1	1	3,6	0,70	10
0	2	0	3,7	0,70	10
0	2	1	5,5	1,8	15
0	3	0	5,6	1,8	15
1	0	0	2	0,10	10
1	0	1	4	0,70	10
1	0	2	6	1,8	15
1	1	0	4	0,71	12
1	1	1	6,1	1,8	15
1	1	2	8,1	3,4	22
1	2	0	6,1	1,8	15
1	2	1	8,2	3,4	22
1	3	0	8,3	3,4	22
1	3	1	10	3,5	22
1	4	0	11	3,5	22
2	0	0	4,5	0,79	15
2	0	1	6,8	1,8	15
2	0	2	9,1	3,4	22
2	1	0	6,8	1,8	17
2	1	1	9,2	3,4	22
2	1	2	12	4,1	26
2	2	0	9,3	3,4	22
2	2	1	12	4,1	26
2	2	2	14	5,9	36
2	3	0	12	4,1	26
2	3	1	14	5,9	36
2	4	0	15	5,9	36
3	0	0	7,8	2,1	22
3	0	1	11	3,5	23
3	0	2	13	5,6	35



**Tabela 3 – Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1mL e 0,1mL em séries de 5 tubos**

(continuação)

Número de tubos com reação positiva quando utilizados, em séries de 5 tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100 mL	Limite de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
3	1	0	11	3,5	26
3	1	1	14	5,6	36
3	1	2	17	6,0	36
3	2	0	14	5,7	36
3	2	1	17	6,8	40
3	2	2	20	6,8	40
3	3	0	17	6,8	40
3	3	1	21	6,8	40
3	3	2	24	9,8	70
3	4	0	21	6,8	40
3	4	1	24	9,8	70
3	5	0	25	9,8	70
4	0	0	13	4,1	35
4	0	1	17	5,9	36
4	0	2	21	6,8	40
4	0	3	25	9,8	70
4	1	0	17	6,0	40
4	1	1	21	6,8	42
4	1	2	26	9,8	70
4	1	3	31	10	70
4	2	0	22	6,8	50
4	2	1	26	9,8	70
4	2	2	32	10	70
4	2	3	38	14	100
4	3	0	27	9,9	70
4	3	1	33	10	70
4	3	2	39	14	100
4	4	0	34	14	100
4	4	1	40	14	100
4	4	2	47	15	120
4	5	0	41	14	100
4	5	1	48	15	120

**Tabela 3 – Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1mL e 0,1mL em séries de 5 tubos**

(conclusão)

Número de tubos com reação positiva quando utilizados, em séries de 5 tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100 mL	Limite de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
5	0	0	23	6,8	70
5	0	1	31	10	70
5	0	2	43	14	100
5	0	3	58	22	150
5	1	0	33	10	100
5	1	1	46	14	120
5	1	2	63	22	150
5	1	3	84	34	220
5	2	0	49	15	150
5	2	1	70	22	170
5	2	2	94	34	230
5	2	3	120	36	250
5	2	4	150	58	400
5	3	0	79	22	220
5	3	1	110	34	250
5	3	2	140	52	400
5	3	3	170	70	400
5	3	4	210	70	400
5	4	0	130	36	400
5	4	1	170	58	400
5	4	2	220	70	440
5	4	3	280	100	710
5	4	4	350	100	710
5	4	5	430	150	1100
5	5	0	240	70	710
5	5	1	350	100	1100
5	5	2	540	150	1700
5	5	3	920	220	2600
5	5	4	1600	400	4600
5	5	5	>1600	700	-

Fonte: APHA, AWWA e WEF (c2017, p. 6).

### 8.1.3.1 Utilização da Tabela 3

- Quando são inoculadas apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados os volumes indicados na tabela (10 mL, 1 mL e 0,1 mL): Neste caso, o NMP é obtido diretamente a partir da tabela 3. Para isto, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente. Consideram-se os exemplos que se seguem na **Tabela 4**, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

**Tabela 4 – Exemplos**

Número de tubos com reação positiva quando utilizados, em séries de 5 tubos, inoculados com:			Código (Combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100 mL
10 mL	1 mL	0,1 mL		
5	2	0	520	49
4	2	0	420	22
5	5	1	551	350
5	5	5	555	>1600

Fonte: Atualizado de CETESB (1993, p. 33)

- Quando são inoculadas apenas três séries de 5 tubos, sendo utilizados volumes decimais diferentes daqueles indicados na tabela 3: Neste caso, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor do NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado pela seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \quad \times \quad \frac{10}{\text{Maior volume inoculado}}$$

Considerem-se os seguintes exemplos (vide **Tabela 5**).

**Tabela 5 – Exemplos**

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:						Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	1(10 <sup>0</sup> ) mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL				
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-2</sup>	-	5	0	0	-	-	500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-3</sup>	-	-	4	1	0	-	410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	3	0	0	300	7,8	$7,8 \times \frac{10}{0,01}$	7800

Fonte: Atualizado de CETESB (1993, p. 33)

- Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados: Neste caso, para a composição do código, são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a três séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontra-se o código na tabela 3, o NMP a ele correspondente e o valor final do NMP é obtido pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Valor do NMP correspondente ao código} \quad \times \quad \frac{10}{\text{Maior volume inoculado para compor o código}}$$

Exemplos (vide **Tabela 6**).

**Tabela 6 – Exemplos**

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:								Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/ 100 mL
	10 mL	10 <sup>0</sup> mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL	10 <sup>-6</sup> mL				
10 a 10 <sup>-2</sup>	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	-	-	-	-	531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1100
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-4</sup>	-	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	-	-	521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7000
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-5</sup>	-	-	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	-	520	49	$49 \times \frac{10}{0,001}$	4,9 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 <sup>5</sup>

**Observação:** números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código

Fonte: Atualizado de CETESB (1993, p. 33)

### 8.1.3.2 Casos especiais

- Se menos que três das diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, para a composição do código são selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (**ver exemplo 1 da Tabela 7**);
- Se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao n<sup>o</sup> de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (**ver exemplo 2 da Tabela 7**);
- Embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores a aqueles selecionados para a formação do código, se isto ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultados positivos nos cinco tubos; seguido do número de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (**ver exemplos 3 da Tabela 7**);

- Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar para a composição do código, as três maiores diluições (ver exemplo 4 da Tabela 7);
- Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar para a formação do código, as três menores diluições (ver exemplo 5 da Tabela 7).

**Observação:** Números grifados correspondem a tubos positivos selecionados para compor o código.

**Tabela 7 – Exemplos**

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	1(10 <sup>0</sup> ) mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL				
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-3</sup>		<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0			410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	170
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-5</sup>		5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	2,2x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-4</sup>	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	0		540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	1,3x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-5</sup>			5	5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	555	>1600	$>1600 \times \frac{10}{0,001}$	>1,6x10 <sup>7</sup>
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-5</sup>			<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	000	< 1,8	$< 1,8 \times \frac{10}{0,1}$	< 180

Fonte: Atualizado de CETESB (1993, p. 35).

## 8.2 Expressão dos resultados

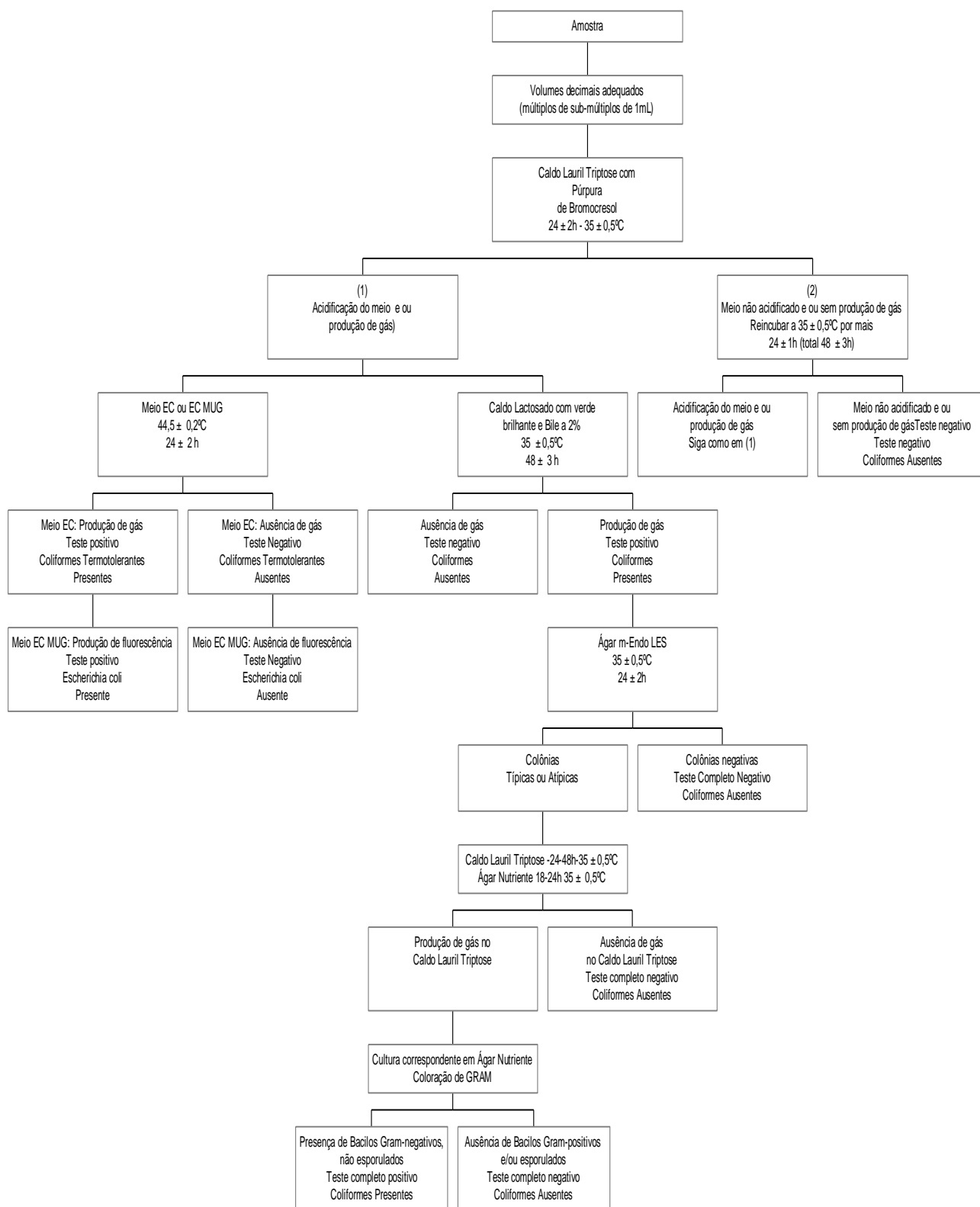
Os resultados são expressos como:

- NMP/100mL de coliformes totais; e
- NMP/100mL de coliformes termotolerantes ou *E. coli*

## Referências

- APHA; AWWA; WEF. Quality assurance/quality control. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Part 9020. Approved by Standard Methods Committee, 2015. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: dez. 2017.
- APHA; AWWA; WEF. Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group: standard total coliform fermentation technique. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Part 9221B. Approved by Standard Methods Committee, 2014. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: dez. 2017.
- APHA; AWWA; WEF. Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group: estimation of bacterial density. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Part 9221C. Approved by Standard Methods Committee, 2014. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: dez. 2017.
- BORDNER, R.; WINTER, J. (Ed). **Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes**. Cincinnati, OH: EPA, 1978. 338 p. (EPA/600/8-78-017). Disponível em: <<http://www.indigowatergroup.com/Files/Lab%20Files/EPA%20Microbiological%20Methods%20Manual.pdf>>. Acesso em: set. 2017.
- CETESB. **M1.001**: lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia: procedimento. São Paulo, 1986. 34 p. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes/>>. Acesso em: set. 2017.
- CETESB. **L5.202**: coliformes totais e fecais - determinação pela técnica de tubos múltiplos: método de ensaio. São Paulo, 1993. 40 p. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes/>>. Acesso em: dez. 2017.
- CETESB. **Análises microbiológicas de amostras ambientais**. São Paulo, 2017. (Cadernos da Gestão de Conhecimento). 1 apostila de curso (134 p.)
- CETESB; ANA. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: set. 2017.
- GELDREICH, E.E. **Handbook for evaluating water bacteriological laboratories**. 2<sup>nd</sup>. ed. Cincinnati, OH: EPA 1975. 196 p. (EPA/670/9-75-006). Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=9100TQ3C.PDF>>. Acesso em: set. 2017.
- USEPA. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**: criteria and procedures quality assurance. 5<sup>th</sup> ed. Cincinnati, OH, 2005. 209 p. + 2 supplements. (EPA 815-R-05-004). Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwlabcert/laboratory-certification-manual-drinking-water>>. Acesso em: set. 2017.

## Anexo A – Esquema do procedimento para determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* pela técnica de tubos múltiplos



Fonte: Atualizado de CETESB (1993, p. 27)