

Unidade IX

Microbiologia de água destinada ao consumo humano

Dorit Schuller

1. Recolha de amostras para análise microbiológica	3
2. Contagem total de microrganismos	4
3. Pesquisa e quantificação de <i>Escherichia coli</i> e de outras bactérias coliformes e de estreptococos fecais	4
4. Interpretação dos resultados	7

Praticamente todas as águas naturais contêm bactérias devido à sua exposição ao ar e ao solo. Na sua maioria tratam-se de microrganismos inofensivos, cujo número e natureza variam consideravelmente de acordo com o lugar e as condições ambientais. Ao longo do seu percurso, as águas naturais, superficiais ou subterrâneas, podem ser contaminadas com microrganismos patogénicos como, por exemplo, os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*, as bactérias *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Mycobacterium*, ou vírus (hepatite A ou polio). Alguns destes organismos podem sobreviver longos períodos de tempo em águas naturais, não necessitando do homem como hospedeiro, enquanto outros possuem uma capacidade de sobrevivência muito reduzida.

Para garantir a ausência de agentes patogénicos, a água destinada ao consumo humano deve ser analisada periodicamente do ponto de vista microbiológico. A aproximação ideal a este problema seria a pesquisa de todos os microrganismos causadores de doenças intestinais e outras, como principal determinação a efectuar numa análise bacteriológica de uma água de abastecimento. Na prática corrente, esta pesquisa só se realiza em casos excepcionais pela dificuldade relativa que apresenta; se presentes numa água, as bactérias patogénicas encontram-se em número restrito e os métodos destinados ao seu isolamento e quantificação são frequentemente longos e complexos. A via mais frequente de contaminação ocorre através de esgotos domésticos contendo excrementos com numerosos microrganismos, pertencentes a espécies patogénicas importantes.

A abordagem geralmente utilizada é a pesquisa de microrganismos, normalmente presentes nos dejectos humanos e de animais que se tornam assim indicadores de contaminação fecal. Este é um princípio universalmente aceite para a vigilância e avaliação da qualidade microbiológica de água para consumo. Utilizam-se como indicadores de contaminação fecal: a bactéria *Escherichia coli* e espécies próximas agrupadas sob a designação de coliformes, os estreptococos fecais e os clostrídios sulfito-redutores, uma vez que todos estes microrganismos obedecem aos seguintes critérios:

- *Encontram-se apenas no conteúdo intestinal de animais de sangue quente.*
- *Existem em densidades que excedem consideravelmente as dos organismos patogénicos presentes em indivíduos infectados.*

- *Verifica-se uma correlação positiva de uma contaminação fecal e a presença do microrganismo indicador.*
- *A sua persistência na água é igual ou superior à dos microrganismos patogénicos mais persistentes.*
- *Apresentam taxas de mortalidade semelhantes às dos patogénicos mais resistentes após desinfeção ou em condições de stresse.*

1. Recolha de amostras para análise microbiológica

As análises microbiológicas de águas descritas neste capítulo são uma versão simplificada dos procedimentos descritos pela legislação actual em vigor. Estas alterações foram introduzidas com o objectivo de evitar o manuseamento de bactérias potencialmente patogénicas por parte dos alunos.

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

1. Utilizar um frasco esterilizado, com um volume de 500 ml.
2. Dependendo das condições específicas de cada local de amostragem (torneira, poço, furo), realizar a recolha da amostra em condições de assépsia.
3. Abrir a torneira e deixar correr a água em jacto forte durante alguns minutos. Fechar a torneira e limpá-la com um pouco de algodão embebido em álcool. A seguir flamejar a torneira. Abrir o frasco de amostragem e encher com água.
4. É importante que a recolha da água seja efectuada no dia da análise. Nos dias de verão, é aconselhável o transporte das amostras numa mala térmica, equipada com termoacumuladores, para evitar alterações nas populações microbianas entre o momento da recolha e da análise da amostra.

2. Contagem total de microrganismos

A metodologia de incorporação em meio sólido constitui uma medida quantitativa directa do número de microrganismos viáveis (que são capazes de se multiplicar) num determinado volume de água.

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

1. Duas horas antes do início da análise preparar e autoclavar meio R2A. A seguir, deixar o meio num banho termostático à temperatura de 45°C até a sua utilização.
2. Agitar vigorosamente a amostra até completa homogeneização.
3. Assepticamente, introduzir 1 ml da amostra (ou de diluições decimais, no caso de água poluída) numa placa de Petri vazia e adicionar ca. 10 ml de meio R2A temperado a 45°C.
4. Agitar cuidadosamente as placas, mantendo-as em posição horizontal na superfície da bancada, com suaves movimentos rotativos, até completa homogeneização do meio com a amostra.
5. Deixar as placas em repouso até o meio solidificar.
6. Incubar em posição invertida, à temperatura ambiente, durante 2 a 3 dias.
7. No final da incubação, contar todas as colónias formadas com o auxílio de um contador.
8. Calcular o número de unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de amostra.

3. Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e de outras bactérias coliformes e de estreptococos fecais

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

1. Agitar vigorosamente a amostra até completa homogeneização.
2. Proceder à esterilização e montagem do conjunto de filtração.



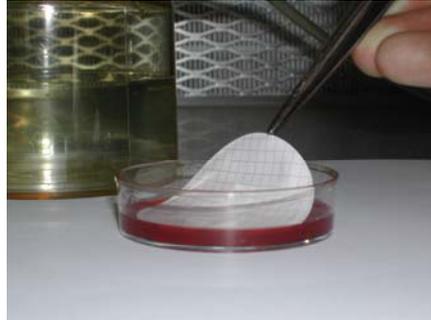
3. Com o auxílio de uma pinça previamente mergulhada em álcool e flamejada, colocar uma membrana estéril entre o funil e o seu suporte, com o retículo virado para cima.



4. Introduzir o volume adequado da amostra a analisar (1, 10, 50 ou 100 ml) no funil e filtrar, utilizando uma seringa ou ligando uma bomba de vácuo. O volume de amostra depende do tipo de água a analisar. Para água de redes de abastecimento é aconselhável a filtração de 100 ml. Para águas de rios ou lagos, o volume de amostra deve ser diminuído e completado a 100 ml (no funil) com água esterilizada.



5. Após a filtração, retirar a membrana com uma pinça esterilizada e colocá-la sobre o meio de cultura contido na placa de Petri, com o retículo virado para cima, evitando que, entre a membrana e o meio de cultura se instalem bolhas de ar.



6. Meios de cultura a utilizar:

- meio Endo Agar - Bactérias coliformes;
- meio Enterococcus Agar - Streptococos fecais;

7. Incubar em posição invertida a 37°C durante 2 dias.



8. No final da incubação, contar todas as colônias formadas, com o auxílio de um contador.

9. Calcular o número de cada grupo de bactérias por 100 ml de amostra.

4. Interpretação dos resultados

Contagem total de microrganismos

Em geral, uma água própria para consumo humano não devia apresentar um número de colónias superior a 100 após incubação a 22°C. Este valor é apenas indicativo, uma vez que os microrganismos podem ser inofensivos fazendo parte da flora natural de águas e de solos. Todavia, quando o número é superior a cerca de 300 colónias, é conveniente ter cuidados na utilização da água no sentido de proceder à sua esterilização (por fervura ou filtração) antes da utilização para consumo humano.

Bactérias coliformes ou estreptococos fecais

A presença destas bactérias torna a água imprópria para consumo humano, indicando a sua contaminação por excrementos humanos e/ou de animais e, conseqüentemente, a presença potencial de outros microrganismos patogénicos.

Os resultados das análises descritas neste capítulo devem ser interpretadas apenas como indicativos. No caso de suspeita de uma contaminação é aconselhável a repetição da análise num laboratório certificado.

Materiais

Equipamento

- 1 Conjunto de filtração com uma fonte de vácuo (seringa ou bomba de vácuo)
- 1 Estufa com temperatura regulável a 37°C
- 1 Banho de água com temperatura regulável a 40 – 50°C
- Contadores de colónias (1 por grupo)

Material de laboratório (por grupo de trabalho)

- Álcool a 96%
- Algodão hidrófilo
- 1 Marcador
- 1 Lamparina ou bico de bunsen
- 1 Pinça
- 2 Pipetas de 1 ml esterilizadas
- 2 Pipetas de 10 ml esterilizadas
- 1 Frasco de recolha de amostras com capacidade de 500 ml, previamente esterilizado
- 1 Frasco (500 ml) com água desionizada esterilizada

Meios de cultura (por grupo de trabalho)

- 2 caixas de Petri vazias esterilizadas
- 1 caixa de Petri com meio M Endo Agar
- 1 caixa de Petri com meio M Enterococcus Agar

Composição e preparação de meios de cultura

Todos os meios são preparados, de preferência a partir de meios desidratados comercializados. Recomenda-se a distribuição dos meios M Endo Agar e M Enterococcus Agar em placas de Petri pequenas, com diâmetro de 47 mm.

R2A Agar

Meio de cultura para o cultivo e a enumeração de bactérias em águas potáveis. Composição (para 1 litro):

Peptona	0,5 g
Extracto de levedura	0,5 g
Casamino-ácidos	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Amido	0,5 g
Piruvato de sódio	0,3 g
Hidrogenofosfato de potássio	0,3 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Agar	15,0

M Endo Agar

Meio de cultura para o cultivo e a enumeração de bactérias coliformes em águas. As colónias típicas de bactérias coliformes apresentam uma cor vermelha intensa com um brilho metálico esverdeado. Outras colónias, vermelhas, cor-de-rosa ou brancas não se consideram como bactérias coliformes. Composição (para 1 litro):

Triptose	10,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levedura	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Hidrogenofosfato de potássio	4,375 g
Dihidrogenofosfato de potássio	1,375 g
Lactose	12,5
Desoxicolato de sódio	0,1 g
Laurilsulfato de sódio	0,05 g
Fucsina básica	1,05 g
Sulfito de sódio	2,1 g
Agar	14,0 g

M Enterococcus Agar

Meio de cultura para o cultivo e a enumeração de enterococcos de origem fecal em águas. As colónias típicas destas bactérias são pequenas (0,5-1 mm) e apresentam uma cor vermelha intensa ou acastanhada. Composição (para 1 litro):

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g

Extracto de levedura	5,0 g
Glucose	2,0 g
Hidrogenofosfato de potássio	4,0 g
Azida sódica	0,4 g
Cloridrato de 2,3,5- trifeniltetrazólio	0,1 g
Agar	10,0 g

	<i>Tópicos de discussão</i>
--	-----------------------------

- Quais são os cuidados a ter na recolha da amostra?
- Qual é objectivo da filtração da amostra de água?
- Que testes adicionais devem ser realizados numa análise de água completa?
- Que tecnologias são utilizadas para tornar uma água própria para consumo humano?

	<i>WWW</i>
--	------------

- <http://snirh.inag.pt/default.htm>
- <http://www.bacteriamuseum.org/niches/foodsafety/watersafety.shtml>
- http://europa.eu.int/comm/environment/youth/water/index_pt.html
- <http://www.epa.gov/safewater/kids/>