

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. em águas para fins recreativos

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Qualidade em Análises
Especialização em Análises de Águas

Marta Sofia Mendes Valente Bernardo

Faro
2007

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. em águas para fins recreativos

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Qualidade em Análises
Especialização em Análises de Águas

Marta Sofia Mendes Valente Bernardo

Faro
2007

Nome: Marta Sofia Mendes Valente Bernardo

Departamento: Faculdade de Ciências e Tecnologia

Orientadora: Doutora Lídia Adéline Pó Catalão Dionísio

Data: 18 de Dezembro de 2007

Título da Dissertação: Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. em águas para fins recreativos

Júri: Presidente: Doutora Isabel Maria Palma Antunes Cavaco

Vogais: Doutora Maria Leonor Faleiro

Doutora Lídia Adéline Pó Catalão Dionísio

Doutora Lília Pinto de Pina Figueiredo Brinca

Este trabalho é da exclusiva responsabilidade da sua autora

Marta Sofia Mendes Valente Bernardo

A ti Mãe.

AGRADECIMENTOS

À Professora Lídia, que desde o primeiro contacto que estabelecemos se manifestou interessada em orientar este trabalho, muito obrigado. Obrigado pela sua disponibilidade, motivação, todo o apoio e compreensão que sempre teve para me dar.

Ao Paulo Pedro agradeço todo o interesse e acompanhamento manifestado durante o trabalho. Obrigado por todo o material fornecido e pela enorme colaboração que deste na realização do trabalho de laboratório.

À Liseta quero agradecer a ajuda preciosa na familiarização com o laboratório de Microbiologia. Obrigado pela total disponibilidade e por saber que poderia sempre contar consigo!

À Andreia, à Teresa e ao Bruno agradeço toda a ajuda e dicas que me deram acerca do funcionamento do laboratório. Obrigado pelo material emprestado, que em determinadas alturas foi determinante para a realização do trabalho!...

À Rosa, obrigado pela companhia que me fizeste no laboratório. Obrigado também pelas pequenas ajudas que me deste, mas que nos dias mais complicados me facilitaram bastante o trabalho.

Aos meus Pais e Irmão, em especial à minha Mãe quero agradecer o desejo de ver atingidos com sucesso os meus objectivos. Obrigado pelo interesse e apoio incondicional, pela força, pela presença e pelas orações. És sem dúvida uma fonte de inspiração e exemplo de vida.

À Duziné e à Tia Rita. Agradeço o interesse demonstrado pelo meu trabalho, obrigado pela ajuda e o incentivo dado nas alturas em que me apeteceu desistir!... Muito obrigado pelo apoio e pela energia positiva que me deu bastante força para o culminar desta etapa!

E a ti Shoffi, agradeço por todos os fins-de-semana, férias e tempos livres que não pudemos partilhar nem gozar! Obrigado pela imensa compreensão, por toda a colaboração e pelo incentivo que me deste nos momentos mais difíceis. Obrigado por todo o amor, amizade, companheirismo e principalmente por acreditares em mim!

RESUMO

A avaliação da qualidade microbiológica de águas para fins recreativos constitui uma actividade de grande importância, dado que é necessário garantir que a utilização deste tipo de águas seja feita sem colocar em risco a saúde humana. A monitorização do estado sanitário das águas no que respeita à contaminação fecal é feita, pela enumeração dos microrganismos indicadores *Escherichia coli* e enterococos através de métodos normalizados. O facto destes métodos não disponibilizarem os resultados em tempo útil, conduziu ao desenvolvimento de métodos mais rápidos e sensíveis para a enumeração dos microrganismos indicadores. A tecnologia de substrato definido desenvolvida pela empresa IDEXX Laboratories, Inc., permite reduzir o tempo de manipulação e de incubação das amostras, assim como o tempo de leitura dos resultados. Com o objectivo de estudar a relação entre os dois métodos aplicados para a enumeração de bactérias coliformes e enterococos, foram analisadas amostras de águas, para fins recreativos, através do método de referência de filtração por membrana e em paralelo através dos testes enzimáticos Colilert[®] e Enterolert[®]. O teste Colilert[®] revelou resultados equivalentes aos obtidos pelo método de referência, ao contrário do teste Enterolert[®] que demonstrou ser estatisticamente diferente do método normalizado. Tomando também em consideração os resultados observados por outros autores conclui-se que, deverão ser analisadas mais amostras. E que a confirmação de uma maior percentagem de presumíveis positivos é essencial, para se conseguir uma maior aproximação do número real de bactérias a enumerar através de ambos os métodos, e assim se poder estabelecer a sua equivalência.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica; Filtração por membrana; Colilert[®]; Enterolert[®]; Microrganismos indicadores; Águas recreativas.

Comparison of the methods used for the enumeration of coliform bacteria, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. in recreational waters

ABSTRACT

Evaluating the microbiological quality of the water that is used for recreational activities is of great importance, since the usage of these waters must be done without endangering human health. The monitorization of the sanitary quality of these waters, when it comes to fecal contamination, is done by standard methods for the enumeration of *Escherichia coli* and enterococci. Due to the time that classical methods need to obtain results, other faster and more sensitive methods have been developed. The defined substrate technology was developed by the company IDEXX Laboratories, Inc., and it allows the reduction of the time spent either in manipulation and incubation of the samples, as well as the time needed for results reading. With the objective of studying the relationship between the two methods applied to the enumeration of coliform bacteria and enterococci, water samples were analyzed in parallel using the reference method of membrane filtration as well as the Colilert[®] and Enterolert[®] enzymatic tests. The results obtained with the Colilert[®] test were equivalent to those obtained using the reference method, but with the Enterolert[®] test the results were statistically different from those obtained with the standard method. Taking in consideration the results observed by other authors, we concluded that more samples should be analyzed. And that a higher number of presumptive positives need to be confirmed, so we can achieve the real number of the enumerated bacteria by both methods and establish their equivalence.

Keywords: Microbiological quality; Membrane filtration; Colilert[®]; Enterolert[®]; Indicator microorganisms; Recreational waters.

ABREVIATURAS

α – Nível de significância

AGAR mENDO LES – Meio de cultura selectivo para enumeração de bactérias coliformes

AGAR mFC – Meio de cultura selectivo para enumeração de coliformes fecais

ANOVA – Análise de variância

BEAA – *Bile Esculin Azide Agar* – Agar BÍlis Esculina Azida

BPL – Boas Práticas de Laboratório

CNE – Comité Europeu de Normalização

CT – Coliformes Totais

CF – Coliformes Fecais

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EI – Enterococos Intestinais

EN – *European Norm* – Norma Europeia

EPA – *Environmental Protection Agency* – Agência para a Protecção do Ambiente

EUA – Estados Unidos da América

FM – Filtração por Membrana

Fluorocult – Caldo Dev Lactose Peptona

FTM – Filtração em Tubos Múltiplos

Gram - – Gram negativa

Gram + – Gram positiva

H₀ – Hipótese nula

H₁ – Hipótese alternativa

IPQ – Instituto Português da Qualidade

IRAR – Instituto Regulador de Águas e Resíduos

ISO – *International Organisation for Standardisation* – Organização Internacional de Normalização

log – Logaritmo de base 10

MLSA – *Membrane Lauryl Sulphate Agar* – Agar Lauril Sulfato

MRC – Material de Referência Certificado

MUG – *4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide* – 4-metil umbeliferil-β-D-glucurónido

NMP – Número Mais Provável

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

ONPG – *ortho-nitrophenyl-β-α-galactopyranoside* – orto-nitrofenil-β-α-galactopiranosídeo

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reacção em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

ρ – Valor de significância

RNA – Ácido ribonucleico

S&B – *Slanetz & Bartley* – Meio de cultura selectivo para enumeração de enterococos

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences* – Pacote estatístico para as ciências sociais

TSA – *Tryptone Soy Agar* – Agar Triptona Soja

TTC – Cloreto de Trifenil Tetrazólio

UE – União Europeia

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
ABREVIATURAS	IX
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. QUALIDADE DAS ÁGUAS NATURAIS	2
<i>1.1.1. Caracterização das águas balneares</i>	<i>2</i>
1.1.1.1. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS.....	2
1.1.1.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	3
1.2. POLUIÇÃO DAS ÁGUAS NATURAIS	4
1.3. MICRORGANISMOS PATOGENICOS TRANSMITIDOS POR VIA HÍDRICA	5
1.4. MICRORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA	6
<i>1.4.1. A família Enterobacteriaceae</i>	<i>7</i>
<i>1.4.2. O género Enterococcus</i>	<i>8</i>
1.5. MÉTODOS PARA DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS	
INDICADORES EM ÁGUAS	9
<i>1.5.1. Métodos analíticos clássicos.....</i>	<i>9</i>
1.5.1.1. TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO EM TUBOS MÚLTIPLOS.....	9
1.5.1.2. TÉCNICA DE FILTRAÇÃO POR MEMBRANA.....	10
<i>1.5.2. Métodos analíticos enzimáticos</i>	<i>11</i>
1.5.2.1. TÉCNICA DE PRESENÇA / AUSÊNCIA	11
1.5.2.2. TÉCNICA DE MULTI-TUBOS E MULTI-POÇOS.....	12
<i>1.5.3. Métodos analíticos moleculares</i>	<i>12</i>
1.5.3.1. TÉCNICA DE DETECÇÃO IMUNOLÓGICA	13
1.5.3.2. TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	14
1.5.3.2.1. Polymerase Chain Reaction	14
1.5.3.2.2. PCR quantitativo em tempo real.....	15
1.5.3.2.3. Microarrays	15
1.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS E ENZIMÁTICOS .	16
<i>1.6.1. Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos clássicos</i>	<i>16</i>

1.6.2. <i>Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos enzimáticos</i>	17
1.6.3. <i>Métodos analíticos clássicos versus métodos analíticos enzimáticos</i>	18
1.7. A “QUALIDADE”	18
1.7.1. <i>Controlo da qualidade</i>	19
1.7.2. <i>Garantia da qualidade</i>	19
1.7.3. <i>Sistemas de qualidade</i>	20
1.7.3.1. NORMAS DA QUALIDADE	20
1.7.3.1.1. Norma NP EN ISO/IEC 17025	21
1.7.3.2. <i>Métodos normalizados</i>	22
1.7.4. <i>Qualidade em laboratórios de análises</i>	22
1.7.4.1. QUALIDADE EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	23
2. OBJECTIVOS	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1. AMOSTRAGEM	27
3.2. MATERIAL DE LABORATÓRIO E EQUIPAMENTO	27
3.3. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES	29
3.3.1 <i>Meios de cultura</i>	29
3.3.2. <i>Reagentes</i>	30
3.4. METODOLOGIA.....	31
3.4.1. <i>Pesquisa de Coliformes Totais e Escherichia coli</i>	31
3.4.1.1. ENUMERAÇÃO	31
3.4.1.1.1. Técnica Quanti-Tray® Colilert®	32
3.4.1.1.2. Técnica de filtração por membrana.....	33
3.4.1.2. CONFIRMAÇÃO	36
3.4.1.3. IDENTIFICAÇÃO	36
3.4.2. <i>Pesquisa de enterococos</i>	40
3.4.2.1. ENUMERAÇÃO	40
3.4.2.1.1. TÉCNICA QUANTI-TRAY® ENTEROLERT®	40
3.4.2.1.2. Técnica de filtração por membrana.....	41
3.4.2.2. CONFIRMAÇÃO	43
3.4.2.3. IDENTIFICAÇÃO	43
3.4.3. <i>Análises físico-químicas</i>	44
3.4.3.1. DETERMINAÇÃO DE PH.....	44

3.4.3.2. DETERMINAÇÃO DE SALINIDADE	45
3.4.4. <i>Análise estatística</i>	45
3.4.4.1. TESTES ESTATÍSTICOS	45
3.4.4.1.1. Comparação entre amostras emparelhadas	46
3.4.4.1.2. Análise de variância – ANOVA	46
3.4.4.2. NORMA ISO 17994:2004 PARA AVALIAÇÃO DA EQUIVALÊNCIA ENTRE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS, <i>ESCHERICHIA COLI</i> E ENTEROCOCOS	50
4.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PH E SALINIDADE	51
4.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS	55
4.4. APRECIÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS PARA FINS RECREATIVOS	58
4.5. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO NORMALIZADO FILTRAÇÃO POR MEMBRANA E A TECNOLOGIA IDEXX	59
4.5.1. <i>Coliformes Totais</i>	59
4.5.2. <i>Escherichia coli</i>	62
4.5.3. <i>Enterococos</i>	64
4.6. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ENUMERAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SELECTIVOS E OS TESTES ENZIMÁTICOS	65
4.6.1. <i>Coliformes Totais</i>	66
4.6.2. <i>Coliformes Fecais</i>	68
4.6.3. <i>Enterococos</i>	69
4.7. TECNOLOGIA IDEXX EM USO NOS LABORATÓRIOS	70
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Colilert[®], tabuleiro de substrato definido para Coliformes Totais e *E. coli*. Após incubação a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 18h a) poços amarelos contabilizados como positivos para Coliformes Totais e b) poços fluorescentes à luz ultravioleta contabilizados como positivos para *E. coli*. 33
- Figura 3.2** – Meio de cultura MLSA selectivo para coliformes totais e *E. coli*. Colónias típicas amarelas e com mudança localizada de cor do meio após incubação a $(36.0\pm 2.0)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$. Colónias atípicas: amarelas, laranja, brancas e rosas sem mudança da cor do meio para amarelo. 35
- Figura 3.3** – Coloração Gram: a) bactérias Gram+ e b) bactérias Gram- (adaptado de Madigan, Martinko & Parker, 1997). 37
- Figura 3.4** – Colónias típicas e atípicas em meios de cultura para enumeração de Coliformes Totais e Coliformes Fecais. a) Meio AGAR mENDO LES, após incubação a $(44.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$ e b) Meio AGAR mFC, após incubação a $(36.0\pm 2.0)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$ 39
- Figura 3.5** – Enterolert[®], tabuleiro de substrato definido para enterococos, após incubação a $(41.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ durante 24h. 41
- Figura 3.6** – Colónias típicas em meio de cultura selectivo *Slanetz & Bartley Agar*, após incubação a $(36.0\pm 2.0)^{\circ}\text{C}$ durante $(44\pm 4)\text{h}$ 42
- Figura 3.7** – Colónias do género *Enterococcus* em meio Agar BÍlis Esculina Azida, com reacção positiva para a esculina após incubação a $(44.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ durante 24h..... 42
- Figura 3.8** – Galeria API 20 Strep (bioMérieux Corporate) para identificação de bactérias do grupo enterococos, após incubação a $(36.0\pm 2.0)^{\circ}\text{C}$ durante 24h. 43
- Figura 4.1** – Enumeração de bactérias Coliformes Totais, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura MLSA e AGAR mENDO LES e pelo teste enzimático Colilert[®]. 52
- Figura 4.2** – Enumeração de *Escherichia coli*, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura MLSA e AGAR mFC e pelo teste enzimático Colilert[®]. A linha

vermelha indica o limite máximo estabelecido pela directiva 2006/7/CE para *E. coli* para águas costeiras e de transição consideradas “boa” qualidade..... 53

Figura 4.3 – Enumeração de enterococcos, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura S&B e BEAA e pelo teste enzimático Enterolert®. A linha vermelha indica o limite máximo estabelecido pela directiva 2006/7/CE para Enterococos Intestinais para águas costeiras e de transição consideradas de “boa” qualidade. 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.I – Meios de cultura usados para enumeração, confirmação e identificação das bactérias estudadas.	29
Tabela 3.II – Reagentes utilizados nos diferentes procedimentos de identificação das bactérias em estudo.....	30
Tabela 3.III – Bactérias pesquisadas, respectivo método de enumeração e técnicas de confirmação e identificação.....	31
Tabela 3.IV – Resultados dos testes para confirmação e identificação de Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i>	39
Tabela 3.V – Resultados de testes para confirmação e identificação de enterococos. ...	44
Tabela 4.I – Valores de pH e salinidade obtidos para o total de amostras analisadas...	55
Tabela 4.II – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de Coliformes Totais e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.....	56
Tabela 4.III – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de <i>Escherichia coli</i> e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.....	57
Tabela 4.IV – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de enterococos e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.....	57
Tabela 4.V – Apreciação da qualidade das amostras de águas para fins recreativos com base na enumeração de <i>Escherichia coli</i> e enterococos, pelos métodos em estudo.....	58
Tabela 4.VI – Comparação dos diferentes meios de cultura selectivos.	67

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Qualidade das águas naturais

A política da União Europeia no domínio do ambiente tem como objectivo um elevado nível de protecção da saúde humana e contribui para a realização dos objectivos de preservação, protecção e melhoria da qualidade do ambiente. Em 1975 com a entrada em vigor da Directiva do Conselho nº 76/160/CEE de 8 de Dezembro relativa à qualidade das águas balneares, a qualidade global deste tipo de águas melhorou consideravelmente. Entretanto, os padrões de utilização das águas balneares mudaram e os conhecimentos científicos e técnicos também evoluíram. Como tal, em 2006 foi feita uma actualização da Directiva de 1975 no que respeita à utilização dos parâmetros de indicadores mais fiáveis (Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho), com vista a permitir a predição dos riscos bacteriológicos e físico-químicos para a saúde e atingir um nível de protecção elevado. Nesta revisão são ainda tomados em consideração novos tipos de águas, tais como para fins recreativos, que adquiriram popularidade devido a alterações sociais e a novos tipos de materiais e equipamentos de desporto. Esta Directiva visa também a preservação, protecção e melhoria da qualidade do ambiente com vista à protecção da saúde humana contra a contaminação química e microbiológica durante as actividades balneares ou outras utilizações da água para fins recreativos. Assim, foram estabelecidas normas sanitárias, disposições para a monitorização, classificação e gestão da qualidade deste tipo de águas.

1.1.1. Caracterização das águas balneares

1.1.1.1. Parâmetros microbiológicos

A classificação da qualidade microbiológica das águas balneares divide-se em: “medíocre”, “suficiente”, “boa” ou “excelente”, de acordo com os critérios

estabelecidos para os parâmetros microbiológicos. Uma água de classificação “excelente” pode apresentar até 100 Unidades Formadoras de Colónias (UFC) de Enterococos Intestinais (EI) por 100mL de amostra. Uma água de classificação “boa” pode apresentar até 200UFC de EI por 100mL de amostra. O método de referência para a análise de Enterococos Intestinais é o descrito na norma ISO 7899-2 (2000). No que respeita ao parâmetro microbiológico *Escherichia coli* (*E. coli*) uma água é considerada “excelente” ou de “boa” qualidade quando não é ultrapassado o valor 250 ou 500UFC por 100mL de amostra, respectivamente. Este parâmetro é analisado pelo método de referência descrito na norma ISO 9308-1 (2000). A classificação de qualidade “suficiente” é atribuída quando os valores de EI enumerados são iguais ou inferiores a 185UFC de EI por 100mL de amostra, e/ou os valores de *E. coli* iguais ou inferiores a 500UFC de EI por 100mL com base numa avaliação de percentil 90, ao contrário das classificações “excelente” e “boa” que são avaliadas com base no percentil 95. A classificação “mediocre” acontece quando são ultrapassados os valores de enumeração de EI e *E. coli* para água de qualidade “suficiente” (Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho).

1.1.1.2. Parâmetros físico-químicos

Relativamente aos parâmetros físico-químicos uma amostra de água é classificada como de “boa” qualidade quando por inspeção visual e olfactiva, se verifica a ausência de película visível à superfície e ausência de odor, isto no que respeita a óleos minerais. Por inspeção visual, deve verificar-se a ausência de resíduos de alcatrão e materiais flutuantes, como madeira, plástico, vidro, borracha ou qualquer outra substância residual. As águas doces são ainda classificadas como de “boa” qualidade quando apresentam um valor de pH entre 6 e 9 (métodos de electrometria com calibração de pH

7 e pH 9) e ausência de variações inexplicáveis (Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho).

1.2. Poluição das águas naturais

A água é essencial à vida. É o constituinte mais característico da Terra, e é talvez o recurso mais precioso que a Terra fornece à Humanidade. Por ser um recurso natural escasso, a água deve ser protegida, defendida e adequadamente tratada e utilizada, em especial as águas de superfície, que são fontes renováveis com uma capacidade limitada de recuperação dos impactos adversos decorrentes das actividades humanas (Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho).

As águas naturais, sejam de carácter doce ou salgado, são cada vez mais utilizadas para fins recreativos, como por exemplo: natação, *surf*, *kite-surf*, *windsurf*, pesca, entre outras. Este tipo de águas estão normalmente sujeitas a um risco particular de poluição seja de origem microbiana, química ou física. A poluição microbiana tem origem em fontes naturais que retêm microrganismos patogénicos; descargas de águas residuais municipais; fossas sépticas particulares; águas de escorrência e águas industriais contaminadas com resíduos humanos ou animais (Cabelli, 1989 & Andreadakis, 1997). A poluição química pode ser proveniente (i) das indústrias, por exemplo os corantes, detergentes sintéticos ou fosfatos; (ii) da agricultura, os adubos e pesticidas; (iii) e das águas domésticas, os detergentes biodegradáveis e outros poluentes orgânicos. A poluição física pode resultar da descarga de material em suspensão ou particulado nas águas (Andreadakis, 1997).

Frequentemente a poluição para além do aspecto desagradável que provoca, pode originar riscos para a saúde humana. Principalmente quando ocorrem contaminações

por bactérias de origem fecal, em que o risco de doenças entéricas associadas à exposição a águas contaminadas com resíduos fecais é significativo (Cabelli, 1989).

1.3. Microrganismos patogénicos transmitidos por via hídrica

A água é um dos veículos privilegiados para a transmissão de microrganismos patogénicos ao Homem. Não só pelo seu consumo, mas também pelo contacto directo, quando as águas naturais são usadas para fins recreativos. As bactérias patogénicas de origem entérica, animal ou humana, são excretadas nas fezes de indivíduos infectados, podendo ser ingeridas pelo consumo de água ou alimentos contaminados (Grabow, 1996). Mas para além das bactérias, também protozoários, fungos e vírus são também abundantes nas águas residuais e podem contaminar as águas naturais (Pelczar, Chan, & Krieg, 1993). Estes microrganismos estão associados a numerosas doenças infecciosas com transmissão por via hídrica, como é o caso da poliomielite, a hepatite de tipo A e outras viroses provocadas por rotavírus e vírus tipo *Norwalk*; gastroenterites de origem bacteriana como salmoneloses (entre as quais a febre tifóide); shigeloses e cólera; disenterias provocadas pela ingestão de cistos de protozoários, como a giardíase e a criptosporidíase; otites e diversas doenças de pele provocadas por fungos (Efstratiou, 2001).

A desinfecção é o tipo de tratamento de água indispensável em sistemas públicos que, conduz à destruição dos microrganismos patogénicos eventualmente existentes (Souza & Daniel, 2005). Em certos tipos de água, a filtração e a desinfecção podem ser inadequadas ou mesmo não aplicáveis, como é o caso especial da água do mar, da água doce dos lagos ou rios poluídos por esgotos, e da água das piscinas e das estâncias termais (<http://www.civil.ist.utl.pt/Seminarios/Viajante/MVambiente.pdf>).

Uma vez que, a contaminação de águas naturais por águas não tratadas pode levar ao aumento do risco de transmissão de doenças para os seres humanos, é necessário que a qualidade sanitária das mesmas seja monitorizada para a presença de contaminação microbiológica, pelas autoridades de saúde pública (Sinton, Donnison & Hastie, 1993).

1.4. Microrganismos indicadores da qualidade da água

A avaliação da qualidade microbiológica da água deve ter em conta a pesquisa de microrganismos associados a doenças entéricas e não de agentes patogénicos específicos. Estes últimos ocorrem em número mais reduzido, e sobrevivem pior no ambiente aquático, fazendo com que o seu isolamento seja dificultado. Por isso, a avaliação da água através da pesquisa de microrganismos patogénicos específicos pode não ser a mais adequada. Desta forma, a monitorização da qualidade microbiológica da água, é feita através da pesquisa de microrganismos indicadores (Efstratiou, 2001 & Rompré *et al.*, 2002).

Um microrganismo indicador de contaminação, deve apresentar características uniformes e estáveis nos vários tipos de águas; possuir propriedades específicas de modo a identificar correctamente o grupo a que pertence. Deve apresentar uma metodologia de enumeração, isolamento e identificação simples e de elevada sensibilidade, de modo a detectar concentrações pequenas do microrganismo indicador. Deve resistir às condições ambientais e processos de desinfecção e não representar um perigo para a saúde humana. Deve sobreviver de forma semelhante ou melhor que o agente patogénico, e por um período de tempo superior. Deve estar presente sempre que esteja presente o microrganismo patogénico, e ausente sempre que não seja detectada contaminação. As concentrações do microrganismo indicador devem ser superiores e

correlacionar-se com as do patogénico e com o grau de poluição (Prescott, Harley & Klein, 1996).

Uma vez que, a contaminação fecal é um factor importante na avaliação da qualidade da água e dos riscos para a saúde humana, a presença de *E. coli*, que normalmente habita o intestino do Homem e de outros animais de sangue quente em amostras de água, evidencia contaminação fecal. A presença de bactérias coliformes pode ser de interpretação mais difícil porque algumas destas bactérias vivem no solo e na água, não sendo sempre de origem intestinal. Assim, a presença de bactérias coliformes, embora não sendo prova de contaminação fecal, poderá indicar a existência de falhas no processo de tratamento ou no sistema de distribuição. A identificação das estirpes isoladas pode, por vezes, dar uma indicação da origem da contaminação (Recomendação do IRAR nº05/2005).

1.4.1. A família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* engloba as bactérias em forma de bastonete, gram-negativas (Gram-), aeróbias e anaeróbias facultativas que produzem ácido a partir da glucose e outros hidratos de carbono (Holt *et al.*, 1994).

Os coliformes são um grupo de bactérias indicadoras que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Este grupo perfaz cerca de 10% dos microrganismos do tracto intestinal humano e dos animais de sangue quente e caracterizam-se por não formarem esporos, ausência da enzima oxidase, capacidade de fermentar a lactose com a produção de ácido e gás em 48h a 35°C. Dentro dos coliformes incluem-se os géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Para além das bactérias entéricas dos géneros acima mencionados o grupo dos coliformes engloba outras cuja origem não é o tracto intestinal (Prescott, Harley & Klein, 1996). Os coliformes fecais são um

subgrupo de bactérias do grupo coliformes totais que normalmente habitam o tracto digestivo de animais de sangue quente, incluindo o Homem, outros mamíferos e as aves. Cada pessoa excreta cerca de dois biliões dessas bactérias por dia. Por isso, esse grupo é utilizado como indicador da contaminação fecal da água e alimentos. Os coliformes termotolerantes são um subgrupo de bactérias do grupo coliformes totais que fermentam a lactose a $(44.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ em $(22 \pm 2)\text{h}$, tendo como principal representante *Escherichia coli*. Esta bactéria de origem exclusivamente fecal tem como habitat exclusivo o tracto intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente, sendo este grupo também denominado por Coliformes Fecais (CF) (Holt *et al.*, 1994).

Deste modo, para estabelecer os padrões de qualidade da água são pesquisados Coliformes Totais (CT) e Fecais (CF). Dentro dos Coliformes Fecais, *E. coli* é considerada a bactéria mais credível, uma vez que, a sua presença está directamente relacionada com a contaminação fecal e conseqüentemente com a possibilidade da presença de outros microrganismos entéricos patogénicos (Rice *et al.*, 1991).

Os Coliformes Fecais e *E. coli* têm sido usados para monitorizar a qualidade da água para fins recreativos. Estudos recentes demonstraram que concentrações elevadas de *E. coli* e enterococos têm sido recuperadas neste tipo de águas e apresentam uma maior correlação com doenças gastrointestinais que as densidades de bactérias coliformes fecais recuperadas. Então, a partir de 2000 para além dos coliformes, também os enterococos passaram a ser usados para monitorizar a qualidade microbiológica da água, seja esta de carácter doce ou salgado (Kinzelman *et al.*, 2003).

1.4.2. O género *Enterococcus*

O género *Enterococcus* inclui bactérias anaeróbicas facultativas, cocos que se podem apresentar isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Gram-positivos (Gram+)

catalase negativos, com crescimento óptimo a (35-37)°C, com capacidade de crescimento a 45°C, suportam concentrações de 6.5% NaCl e hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares. A espécie *Enterococcus faecalis*, encontra-se quase constantemente e em grande número no tracto intestinal dos animais de sangue quente. Neste grupo incluem-se também *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* e *E. gallinarum* (Prescott, Harley & Klein, 1996).

1.5. Métodos para detecção e enumeração de microrganismos indicadores em águas

Os métodos para detecção e enumeração de microrganismos indicadores em águas podem ser divididos em clássicos, enzimáticos e moleculares.

1.5.1. Métodos analíticos clássicos

Os métodos analíticos clássicos para análise microbiológica de águas são: a técnica de fermentação em tubos múltiplos através da qual se estima o Número Mais Provável (NMP) de microrganismos na amostra; e a técnica de filtração por membrana em que se enumera directamente o número de Unidades Formadoras de Colónias na amostra.

1.5.1.1. Técnica de fermentação em tubos múltiplos

A fermentação em tubos múltiplos é uma técnica através da qual se calcula o NMP de microrganismos por 100mL de amostra, após o seu crescimento em meio líquido. Uma análise completa envolve um teste presuntivo, em que são incubadas séries de diluições decimais da amostra em grupos de 3 ou 5 tubos por diluição, num meio moderadamente selectivo. Seguido de um passo de confirmação dos tubos com

resultado positivo em meio mais selectivo. E o teste completo implica uma série de etapas que permitem uma avaliação de reacções típicas dos microrganismos por testes bioquímicos, serológicos ou enzimáticos e uma coloração Gram. Todo o processo exige pelo menos 4 dias de incubações e repicagens (Prescott, Harley & Klein, 1996; Oblinger & Koburger, 1983 e Figueras *et al.*, 2000).

O NMP está directamente relacionado com a frequência de ocorrência de uma série de resultados positivos, que são mais prováveis de acontecer quando um dado número de microrganismos está presente na amostra (Prescott, Harley & Klein, 1996; Oblinger & Koburger, 1983 e Figueras *et al.*, 2000). Este número é uma estimativa estatística da média de microrganismos viáveis presentes na amostra. Como tal, esta técnica dá-nos uma enumeração semi-quantitativa, em que a precisão da estimativa é baixa e depende do número de tubos usados para a análise (Rompré *et al.*, 2002).

1.5.1.2. Técnica de filtração por membrana

A técnica de filtração por membrana enumera, os microrganismos em pesquisa numa membrana colocada à superfície do meio de cultura estabelecendo o número de UFC por 100mL de amostra. A análise consiste na filtração de um dado volume de amostra de água através de uma membrana de éster de celulose que é depois colocada sobre um meio selectivo. Após a incubação à temperatura adequada as colónias típicas são contadas e transferidas para um meio de cultura confirmativo. É então feita uma avaliação de reacções típicas dos microrganismos por testes bioquímicos, serológicos ou enzimáticos e também a coloração Gram (Bancroft, Nelson & Childers, 1989 e (American Public Health Association, 1998).

1.5.2. Métodos analíticos enzimáticos

Os métodos analíticos enzimáticos de detecção e enumeração de microrganismos em águas baseiam-se na tecnologia de substrato definido, e encontram-se disponíveis sob a forma de resposta presença / ausência ou enumeração em multi-tubos e multi-poços. Nestes métodos, o substrato definido é usado como fonte de nutrientes vital aos microrganismos em pesquisa. Durante a incubação é libertado do substrato definido um cromóforo ou fluoróforo, indicando a presença do microrganismo alvo (Rompré *et al.*, 2002). Nestes métodos pode também ser feita uma estimativa do NMP de microrganismos presentes na amostra, com base nas suas propriedades bioquímicas (Edberg *et al.*, 1990).

1.5.2.1. Técnica de presença / ausência

O método analítico enzimático baseado na presença / ausência resulta da simplificação do método clássico do NMP, com a finalidade de obter uma informação apenas qualitativa para um volume de 100mL de amostra. Dado que, teoricamente a água para consumo (fornecidas por sistemas de abastecimento público, redes de distribuição, camiões ou navios cisterna, ou utilizada numa empresa da indústria alimentar) não deverá apresentar microrganismos por 100mL de amostra (American Public Health Association, 1998). Assim, são homogeneizados 100mL de amostra com uma mistura de ingredientes em pó num frasco adequado. A mistura fica incolor. Após incubação adequada às condições de crescimento dos microrganismos em pesquisa a alteração de cor significa que houve hidrólise do substrato logo o teste é positivo. Não são necessários testes de confirmação e é possível detectar microrganismos em stresse fisiológico num tempo máximo de 24h (Edberg *et al.*, 1990 e Rompré *et al.*, 2002).

1.5.2.2. Técnica de multi-tubos e multi-poços

Os métodos analíticos enzimáticos de enumeração de microrganismos podem ser realizados em multi-tubos ou multi-poços (American Public Health Association, 1998). Para o sistema multi-poços a empresa IDEXX Laboratories, Inc. desenvolveu a tecnologia Quanti-Tray[®] que se aplica a análises de águas (Edberg *et al.*, 1990). O meio de cultura desenvolvido para o microrganismo em pesquisa é dissolvido e homogeneizado em 100mL de amostra ou diluição da mesma. A suspensão é vertida para um tabuleiro de incubação constituído por 97 poços individuais, e incubada à temperatura adequada. O sistema Quanti-Tray[®] é fechado a vácuo o que impede a ocorrências de contaminações da amostra. Os resultados são lidos directamente do tabuleiro e a determinação do NMP por 100mL de amostra é feita com base numa tabela de NMP (<http://www.idexx.com/water/>). Esta técnica não requer preparação de material nem meios de cultura antes do processamento das amostras, o que a torna mais eficiente que as técnicas clássicas (Chihara *et al.*, 2005).

1.5.3. Métodos analíticos moleculares

Os métodos analíticos moleculares baseiam-se na detecção imunológica ou na amplificação de ácidos nucleicos específicos. Estes métodos foram desenvolvidos para aumentar a rapidez da análise e atingir um grau de sensibilidade e especificidade elevado, não sendo necessários passos adicionais de cultura nem de confirmação (American Public Health Association, 1998). Deste modo, estes métodos permitem a detecção de microrganismos específicos cultiváveis ou não em poucas horas, ao contrário dos métodos clássicos que demoram dias. Nestes métodos a especificidade depende do grau de conservação filogenético da sequência nucleotídica dentro do grupo taxonómico alvo. Oferecem informação a diferentes níveis, tais como classe, género,

espécie e subespécie. Podem mesmo ser identificados microrganismos que não seriam detectados nas técnicas de cultura. Para além de poderem ser usados como ferramentas de identificação de novas entidades patogénicas (Rompré *et al.*, 2002).

1.5.3.1. Técnica de detecção imunológica

Os métodos de detecção imunológica baseiam-se no reconhecimento específico entre anticorpos e antígenos, e na elevada afinidade que é característica desta reacção de reconhecimento. Dependendo do nível taxonómico dos antígenos alvo, os métodos imunológicos permitem a detecção de antígenos a nível da família, género, espécie ou serótipo. Estes métodos podem ser processados directa ou indirectamente. Num processo de imunofluorescência directo, o anticorpo específico é conjugado directamente com o fluorocromo. Um processo indirecto envolve a ligação do anticorpo primário específico ao antígeno alvo, seguido da adição de um anticorpo marcado com o fluorocromo directamente contra o anticorpo primário. A detecção imunológica pode ser feita através de sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA) para um gene específico, e anticorpos com marcação fluorescente que permitem a visualização microscópica directa dos microrganismos alvo. Pode também ser feita por sondas específicas desenhadas para a hibridação com sequências de ácidos nucleicos que sinalizam a presença, na amostra, de um organismo particular. É uma técnica simples e rápida, cuja exactidão depende maioritariamente da especificidade do anticorpo e em que é possível a identificação e enumeração de uma simples célula presente numa amostra (Rompré *et al.*, 2002).

1.5.3.2. Técnica de amplificação de ácidos nucleicos

Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos baseiam-se nas propriedades de hibridação molecular, que envolve o reconhecimento de uma sequência complementar entre um ácido nucleico sonda e um ácido nucleico alvo. Esta reacção de hibridação pode dar-se entre sonda de DNA (Ácido desoxirribonucleico) e sequência de DNA cromossómica (hibridação DNA–DNA) e entre sonda de DNA e sequências de RNA ribossomal ou de RNA de transferência (hibridação DNA–RNA) (Rompré *et al.*, 2002).

1.5.3.2.1. *Polymerase Chain Reaction*

A técnica de amplificação de sequências de ácidos nucleicos – reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) – permite a amplificação *in vitro* ou *in situ* de sequências de DNA. Esta amplificação é exponencial e possível a partir de poucas cópias da sequência específica, chegando em poucas horas, até aproximadamente um milhão. Consiste na repetição de ciclos de replicação cuja reacção em cadeia é catalizada por uma DNA polimerase e pelo uso de oligonucleótidos de iniciação (*primers*). Esta técnica completa envolve um passo de extracção de DNA seguida de ciclos de replicação *in vitro*. Uma vez que, são amplificadas sequências de DNA específicas para os microrganismos em pesquisa, a escolha correcta da sequência a amplificar, assim como, o uso de condições de amplificação suficientemente restritivas torna este tipo de detecção muito selectivo e sensível (Kreader, 1995 e Rompré *et al.*, 2002). Esta técnica tem a grande vantagem de não necessitar de cultura dos microrganismos alvo, o que permite a sua rápida identificação (Scott *et al.*, 2002). Para além disso, e uma vez que se baseia em sequências de DNA, não está dependente de características que podem ou não estar presentes ou a ser expressas em todas as condições ambientais, tais como actividades enzimáticas específicas ou características

morfológicas. A informação codificada no DNA é um meio de detecção quer haja expressão fenotípica ou não (Kreader, 1995). Esta técnica permite ainda a detecção de microrganismos viáveis, mas que por estarem sob condições de stresse não crescem em meios de cultura (Gulec *et al.*, 2002).

1.5.3.2.2. PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é uma versão modificada da técnica de PCR, em que é possível fazer a quantificação dos microrganismos indicadores ainda mais rapidamente, ou seja, em menos de 2h (Wade *et al.*, 2006). Os produtos de amplificação são marcados com fluorocromos e são detectados num termociclador que mede o sinal de fluorescência durante os ciclos de amplificação. O sinal está relacionado com a quantidade de produtos de PCR amplificados. Uma vez, que é possível detectar os produtos de amplificação durante a fase logarítmica inicial determina-se a quantidade de sequência específica existente no início da reacção (Noble & Weisberg, 2005).

1.5.3.2.3. Microarrays

Os *microarrays* ou *microchips* envolvem a ligação de uma sonda de cDNA no *slide* ou *array* e o DNA alvo. Quando a hibridação entre a sequência de interesse específica e o DNA alvo acontece, existe uma alteração de cor que indica uma reacção positiva. A fluorescência gerada na superfície do *slide* é detectada e quantificada para determinar quantidade relativa da sequência específica no DNA alvo. Num único *microarray* podem ser analisados ao mesmo tempo milhares de microrganismos. (Noble & Weisberg, 2005).

1.6. Comparação entre os métodos analíticos clássicos e enzimáticos

1.6.1. Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos clássicos

O método analítico clássico da fermentação em tubos múltiplos apresenta como principais vantagens a possibilidade de analisar tanto amostras límpidas como amostras turvas; a recuperação de microrganismos sob stresse; e um curto espaço de tempo e esforço para iniciar o processamento das amostras, o que pode realizar-se a qualquer hora do dia (Figueras *et al.*, 2000). No entanto, pode tornar-se uma técnica que implica trabalho de laboratório intensivo, quando são necessárias fazer muitas diluições das amostras. Trata-se de uma técnica que pode ser realizada por técnicos com formação básica em microbiologia, e é relativamente barata, uma vez que, não requer equipamento muito sofisticado (Rompré *et al.*, 2002). O método analítico clássico da fermentação em tubos múltiplos apresenta como desvantagens o tempo, volume de trabalho e material necessários para analisar uma amostra. É constituído por três fases, em que cada uma demora 24 ou 48h leva a que sejam necessários 3 a 5 dias até se completar a análise. É um método de enumeração indirecto muito antigo (Oblinger & Koburger, 1983), que disponibiliza resultados com pouca precisão em termos qualitativos e quantitativos (Rompré *et al.*, 2002). Uma vez que, apenas permite uma estimativa do número de microrganismos presentes, o valor verdadeiro (95% do limite de confiança) pode apresentar uma variação considerável do NMP (Figueras *et al.*, 2000). Muitos factores interferem com a detecção dos microrganismos através fermentação em tubos múltiplos especialmente durante o teste presuntivo. Por exemplo, a interferência do número elevado de microrganismos que não são alvo da pesquisa assim como, a inibição proveniente da natureza dos meios de cultura (Rompré *et al.*, 2002).

O método analítico clássico de filtração por membrana apresenta como principais vantagens a enumeração directa do número de microrganismos com elevada precisão e exactidão; a formação de uma colónia visível a partir de um microrganismo permite o seu isolamento para posterior caracterização e identificação; a possibilidade de processar grandes volumes de amostra aumentando a sensibilidade do método (Figueras *et al.*, 2000). As principais desvantagens que o método analítico clássico de filtração por membrana apresenta são, o facto de não se poder aplicar a amostras de águas turvas com baixa concentração microbiana, cuja matéria em suspensão pode obstruir a membrana ou impedir o crescimento dos microrganismos alvo; possibilidade de não recuperação dos microrganismos que se encontram sob stresse ou enfraquecidos (Rompré *et al.*, 2002). Resultados falsos negativos devido à incapacidade de alguns microrganismos viáveis presentes em águas naturais crescerem. Resultados falso positivos quando microrganismos não alvo formam colónias semelhantes às colónias alvo (Figueras *et al.*, 2000). O método da filtração por membrana é o mais utilizado, porém, revela-se muito trabalhoso quando é necessário analisar muitas diluições da amostra (Kinzelman *et al.*, 2003).

1.6.2. Vantagens e desvantagens dos métodos analíticos enzimáticos

Os métodos analíticos enzimáticos possuem a grande vantagem de abreviar o tempo necessário para a obtenção dos resultados. Melhoraram a produtividade laboratorial, simplificam o trabalho e reduzem os custos. São métodos que possuem uma maior sensibilidade e especificidade que os métodos clássicos, e no caso da tecnologia Quanti-Tray[®] é uma técnica fácil de executar, requerendo reduzida mão-de-obra e pouco especializada (Rompré *et al.*, 2002).

1.6.3. Métodos analíticos clássicos *versus* métodos analíticos enzimáticos

Os métodos analíticos clássicos usados para a enumeração de microrganismos são geralmente baseados em reacções metabólicas. Por isso, não são completamente específicos, e são necessários testes adicionais para confirmação. O uso de perfis enzimáticos para detectar microrganismos (princípio em que se fundamentam os métodos analíticos enzimáticos) é uma alternativa atractiva aos métodos analíticos clássicos e tem sido amplamente estudada. Isto porque são reacções rápidas e sensíveis, e podem ser específicas a nível do grupo, género ou espécie, consoante a enzima alvo. Os métodos analíticos clássicos (fermentação em tubos múltiplos e filtração por membrana) impedem o crescimento de microrganismos não alvo através da incorporação nos meios de cultura de químicos inibidores. Os métodos analíticos enzimáticos (tecnologia de substrato definido) têm como princípio, disponibilizar alimento apenas para os microrganismos em pesquisa (Rompré *et al.*, 2002).

1.7. A “Qualidade”

Quando se fala de “qualidade”, pensamos em produtos ou serviços de excelência, que satisfaçam plenamente os nossos requisitos, normalmente baseados na finalidade e preço do produto ou serviço (Besterfiel, 1986). Do ponto de vista empresarial a “qualidade” é o conjunto de todas as características e finalidades de um produto ou serviço, que contribuem para a satisfação das necessidades do cliente (Fey & Gogue, 1983 e Besterfiel, 1986). As necessidades envolvem questões como: preço, segurança, disponibilidade, manutenção, confiança e utilidade. O preço é fácil de definir em unidades monetárias, mas as outras características não, pois são traduzidas em especificações particulares no fabrico de um produto ou na prestação de um serviço. A conformidade de um produto ou serviço com as respectivas especificações é possível de

medir, e permite definir quantitativamente a qualidade. Então “qualidade” é a conformidade de um produto ou serviço com as especificações. O grau de conformidade é a medida da “qualidade” (Besterfiel, 1986).

1.7.1. Controlo da qualidade

Sempre que as especificações de um produto ou serviço não satisfazem as necessidades do cliente, estas devem ser revistas. Esta acção está inserida no controlo da qualidade, que integra as técnicas e actividades para alcançar, sustentar e melhorar a qualidade de um produto ou serviço (Besterfiel, 1986).

A partir das necessidades do cliente são definidas as especificações relativas a um determinado produto ou serviço. Estes são projectados, produzidos ou instalados e inspeccionada a conformidade com as suas especificações. Uma vez que, o objectivo é a melhoria contínua da qualidade, é também muito importante rever a utilização dos produtos ou serviços, para obter informações caso seja necessário corrigir as especificações estabelecidas. Tudo isto proporciona ao cliente a obtenção de um melhor produto ou serviço com menor custo (Besterfiel, 1986).

1.7.2. Garantia da qualidade

Todas as acções necessárias para confirmar que produtos ou serviços irão satisfazer as necessidades do consumidor estão contempladas na “garantia da qualidade”. Esta assegura que a qualidade do produto ou serviço corresponde efectivamente ao estabelecido, e implica que haja uma contínua avaliação da adequação e eficiência, de modo a haver medidas correctivas onde for necessário (Besterfiel, 1986).

1.7.3. Sistemas de qualidade

O sistema de qualidade é uma base organizacional que ajuda a entidade responsável pelo fabrico de um produto ou prestação de um serviço a melhorar continuamente os níveis de satisfação de seus clientes. Trata-se de um conjunto de procedimentos, responsabilidades, processos e recursos que a empresa estabelece e põe em prática com vista à implementação da gestão da qualidade. É dentro do sistema da qualidade de uma empresa que se encontram documentadas as técnicas e actividades do controlo da qualidade e as acções da garantia da qualidade. A empresa define os seus objectivos e prova-o através destes documentos (Cavaco, 2004).

1.7.3.1. Normas da qualidade

Cada empresa pode desenvolver um sistema da qualidade próprio, e que mais se adapte às suas necessidades. Mas existem normas para sistemas da qualidade com linhas directrizes, de modo a que estas não difiram significativamente e se torne mais fácil a comunicação entre empresas e clientes. As normas descrevem como deve ser organizado o sistema da qualidade de uma entidade consoante a sua área de trabalho. Assim, existem as normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) publicadas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), que se destinam a laboratórios que testam produtos sujeitos a legislação antes de serem disponibilizados no mercado. A Organização Internacional de Normalização (ISO) criou um conjunto de normas da qualidade para empresas fornecedoras de produtos ou serviços; a família das normas ISO 9000. Estas normas garantem a conformidade de um produto ou serviço de acordo com as especificações estabelecidas, mas não são suficientes para garantir a competência de um laboratório para realizar análises. Para tal a ISO criou o Guia ISO 25, uma norma específica para os laboratórios de análises de

rotina. A nível da Europa o Comité Europeu de Normalização (CEN) é o organismo normalizador. Este criou as normas EN 29000 baseadas nas ISO 9000 e as EN 45000 baseadas no Guia ISO 25. Mais tarde, a Norma EN 45001 foi substituída pela Norma EN ISO/IEC 17025, mais semelhante ao Guia ISO 25. Em Portugal, o organismo normalizador é o Instituto Português da Qualidade (IPQ), que adapta as normas emitidas pelo CEN mas também pode criar regras específicas para sistemas da qualidade. O IPQ emitiu um guia interpretativo da norma NP EN ISO/IEC 17025 LAB/G00 que foi actualizado em 2006 para o guia OGC001 interpretativo da norma NP EN ISO/IEC 17025 versão de 2005 (Cavaco, 2004).

1.7.3.1.1. Norma NP EN ISO/IEC 17025

A primeira edição da norma NP EN ISO/IEC 17025 resultou da vasta experiência de aplicação do Guia ISO/IEC 25 e da norma EN 45001, que foram por ela substituídos. Incluía todos os requisitos que os laboratórios de ensaio e calibração têm que satisfazer ao pretenderem demonstrar que possuem um sistema de gestão, que são tecnicamente competentes e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos. Uma vez que, as normas ISO 9001:1994 e ISO 9002:2000 foram substituídas pela ISO 9001:2000 e estas eram referidas na NP EN ISO/IEC 17025:2000, esta foi revista donde surgiu a segunda edição de 2005 (Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005).

A norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 é aplicável a todas as entidades que realizam ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem. Destina-se a ser utilizada pelos laboratórios no desenvolvimento dos seus sistemas de gestão para a qualidade, e para as actividades administrativas e técnicas. Pode também ser usada pelos clientes dos laboratórios, pelas entidades regulamentadoras e pelos organismos de acreditação afim

de confirmar e reconhecer a competência dos laboratórios (Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005).

1.7.3.2. Métodos normalizados

Segundo o Guia interpretativo da NP EN ISO/IEC 17025 OGC001 de 2006, métodos normalizados são métodos de ensaio que seguem uma norma, ou documento normativo equivalente elaborado por um organismo de normalização ou por um organismo sectorial integrando representantes do sector técnico. Estes métodos após devidamente validados, estão sujeitos a actualização periódica e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional (Guia Interpretativo da Norma NP EN ISO/IEC 17025 OGC001, 2006).

O laboratório deve utilizar métodos de ensaio e/ou calibração e métodos de amostragem adequados à satisfação das necessidades do cliente. Devem ser métodos apropriados ao ensaio e/ou calibração a realizar, preferencialmente publicados em normas internacionais, nacionais ou regionais (Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005).

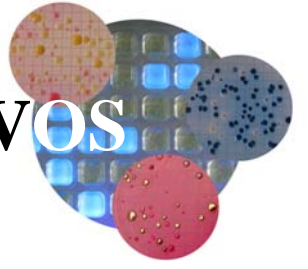
1.7.4. Qualidade em laboratórios de análises

Em laboratórios de análises o que se produz são os resultados das análises realizadas, e a interpretação que se pode fazer desses mesmos resultados. A qualidade de uma análise não incide apenas na obtenção de resultados com as especificações definidas pelo cliente, mas também se o laboratório tem competência para realizar essas mesmas análises. Só assim o cliente pode confiar nos resultados (Cavaco, 2004).

1.7.4.1. Qualidade em laboratórios de análises microbiológicas

As análises microbiológicas incluem testes de esterilidade, pesquisa, isolamento, contagem e identificação de vírus, bactérias, micoplasmas, fungos e protozoários, assim como, a detecção dos seus metabolitos em diferentes materiais e produtos. Incluem-se também qualquer tipo de ensaios que utilizem microrganismos como uma parte do sistema de detecção, assim como a utilização de microrganismos para estudos ecológicos (Guia RELACRE 6). Os laboratórios de análises microbiológicas podem também implementar os seus sistemas de qualidade com base na norma NP EN ISO/IEC 17025. Contudo, existe internacionalmente o documento EA – 4/10 *Accreditation for Microbiological Laboratories*, assim como a nível nacional o Guia RELACRE 6 – Acreditação de laboratórios de ensaios microbiológicos, que permitem um suporte mais específico na interpretação desta norma para os laboratórios de análises microbiológicas. Nestes guias, os laboratórios de microbiologia encontram as directrizes a seguir, relativas ao pessoal; ao ambiente do laboratório; ao equipamento; aos reagentes e meios de cultura; aos procedimentos e métodos de análise, sua validação e verificação de funcionamento; à garantia da qualidade dos resultados e controlo da qualidade. Estes documentos estão mais centrados na qualidade dos resultados e não tanto nos aspectos da saúde e segurança. Assim, os laboratórios devem seguir as práticas de saúde e segurança regulamentadas no seu país (Ea/Eurachem, 2002 e Guia RELACRE 6).

2. OBJETIVOS



2. OBJECTIVOS

- Pretendeu-se com este estudo contribuir para a avaliação dos testes enzimáticos da tecnologia IDEXX, à semelhança do que está a ser feito por toda a Europa, no sentido de se encontrar métodos fiáveis, rápidos e de menor custo, que possam substituir os métodos normalizados, actualmente em vigor.
- O objectivo principal do presente trabalho consistiu na avaliação da equivalência entre os métodos enzimáticos da tecnologia IDEXX e o método normalizado filtração por membrana, que são usados para analisar a qualidade microbiológica de amostras de águas.
- O objectivo secundário consistiu na comparação da eficiência de recuperação de diferentes meios de cultura selectivos para enumeração de Coliformes Totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. através da técnica filtração por membrana.

3. PARTE EXPERIMENTAL



3. PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram analisadas amostras de águas naturais de diferentes proveniências, tais como: estuários, lagos e rios.

3.1. Amostragem

As amostras de água foram colhidas em frascos de plástico de 500mL estéreis, a 30 cm da superfície da água, e transportadas para o laboratório em geleiras com acumuladores térmicos afim de se manter a temperatura na ordem dos 4°C. As análises iniciaram-se logo após a chegada das amostras ao laboratório. O período decorrido entre a colheita e a análise não ultrapassou as 6h, como o exigido pelas normas NF EN ISO 9308-1 e NF EN ISO 7899-2.

3.2. Material de laboratório e equipamento

Para a realização deste trabalho usou-se o seguinte material e equipamento:

- Ansas de platina, níquel/crómio ou plástico;
- Autoclave, aparelho para esterilização por calor húmido – KYORITSU New Recorder Model 5351 com módulo; JP SELECTA, Barcelona, Espanha;
- Balança – ACCULAB VIC 1501 Máx=1500G d=0.1G; Sartorius Group; Goettingen, Alemanha;
- Bico de Bunsen;
- Bomba de vácuo – Gast Manufacturing Corp. Benton Harbor 1.9/2.2 Amps MILLIPORE;
- Camara de fluxo laminar – Kojair KR-125 Safety; Vilppule, Finlândia;
- Condutivímetro Crison GLP32; Barcelona, Espanha;

- Estufas de incubação, controladas por termóstato regulado – MMM Medcenter Incucell; Munique, Alemanha;
- Frascos de vidro *Schott* de 1L resistentes à esterilização em autoclave;
- Frigorífico e congelador – Fagor Elegance double fresh; Carnaxide, Portugal;
- Lâmpada de luz ultravioleta com comprimento de onda 365nm – Long Wave Ultra Violet 365nm Spectronics Crop; Nova Iorque, EUA;
- Lâminas de vidro e lamelas;
- Pipetas de vidro graduadas;
- Placa de agitação e aquecimento – Velp Scientifica; Interface-Equipamentos e Reparações Técnicas Lda; Amadora, Portugal;
- Provetas de vidro graduadas;
- Medidor de pH, com precisão e exactidão de $\pm 0,1$ – Crison GLP22; Barcelona, Espanha;
- Membranas filtrantes de ésteres de celulose, com 47mm de diâmetro, poro com diâmetro de $0,45\mu\text{m}$ e com grelha – GN-6 Metricel; PALL Gelman Laboratory; EUA;
- Micropipetas – Gilson; Middleton, EUA;
- Microscópio óptico;
- Óculos protecção UV – EN 166F CE bollé;
- Pinça de pontas arredondadas, para manuseamento das membranas;
- Placas de Petri de 60 e 90mm – NORMAX; Marinha Grande, Portugal;
- Rampa de filtração por membrana – MILLIPORE; Interface-Equipamentos e Reparações Técnicas Lda; Amadora, Portugal;
- Seladora a vácuo – Quanty-Tray[®] Sealer Model 2× IDEXX; Westbrook, EUA;

- Vórtex – Velp Scientifica Zx³; Interface-Equipamentos e Reparações Técnicas Lda; Amadora, Portugal.

3.3. Meios de cultura e reagentes

3.3.1 Meios de cultura

Os meios de cultura disponibilizam aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Cada grupo de microrganismos tem necessidades nutricionais específicas, como tal, os meios são escolhidos de modo a satisfazer essas necessidades. A incubação dos meios de cultura, após a inoculação da amostra de água, permite o desenvolvimento dos microrganismos que resulta na formação de colónias típicas (no caso de meios sólidos) o que facilita a identificação dos mesmos.

Neste trabalho os meios de cultura utilizados para a enumeração e identificação dos microrganismos pesquisados foram escolhidos de acordo com as normas em vigor e estão discriminados na Tabela 3.I.

Tabela 3.I – Meios de cultura usados para enumeração, confirmação e identificação das bactérias estudadas.

Bactérias	Meio de cultura selectivo	Meio de cultura confirmativo	Meio de cultura não selectivo
Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i>	Agar Lauril Sulfato (Oxoid)	Caldo Dev Lactose Peptona (Merck)	Agar Triptona Soja (Biokar Diagnostics)
	AGAR mENDO LES (Biokar Diagnostics)	Caldo Dev Lactose Peptona (Merck)	
Coliformes Fecais	AGAR mFC (Biokar Diagnostics)	Caldo Dev Lactose Peptona (Merck)	
Enterococos	Slanetz & Bartley Agar (Biokar Diagnostics)	Agar BÍlis Esculina Azida (Biokar Diagnostics)	

Para a realização das diferentes metodologias foram adquiridos meios de cultura na sua forma desidratada. A reconstituição dos mesmos foi realizada no local de preparação de meios do laboratório, segundo as instruções do fabricante.

3.3.2. Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados reagentes de uso comum em laboratório, mas também reagentes específicos de um laboratório de microbiologia, que se encontram descritos na Tabela 3.II.

Tabela 3.II – Reagentes utilizados nos diferentes procedimentos de identificação das bactérias em estudo.

Teste / Finalidade	Reagente	Bactérias
Coloração Gram	Violeta Cristal (Merck)	Coliformes e Enterococos
	Lugol (Merck)	
	Álcool (Aga)	
	Safranina (Merck)	
	Óleo de imersão	
Produção de indol	Kovac's (Merck)	<i>Escherichia coli</i>
Presença da catalase	Peróxido de Hidrogénio 3% (Fluka)	Enterococos
Presença da oxidase	Oxidase (Merck)	Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i>
Crescimento em meio selectivo	Ácido Rosólico (Merck)	Coliformes Fecais
Diluição das amostras	Soluto de Ringer (Biokar Diagnostics)	---
Galerias API	Parafina líquida	---

(---) Não aplicável.

3.4. Metodologia

Este trabalho foi realizado com recurso a metodologias de enumeração, confirmação e identificação das bactérias em pesquisa, que se encontram resumidas na Tabela 3.III.

Tabela 3.III – Bactérias pesquisadas, respectivo método de enumeração e técnicas de confirmação e identificação.

Bactérias	Enumeração	Confirmação	Identificação
Coliformes Totais	Colilert® (IDEXX Laboratories, Inc.)	---	---
	Método baseado na NF EN ISO 9308-1 (Setembro 2000)	Teste da oxidase	Coloração Gram
			Galerias API 20 E (bioMérieux Corporate)
<i>Escherichia coli</i>	Colilert® (IDEXX Laboratories, Inc.)	---	---
	Método baseado na NF EN ISO 9308-1 (Setembro 2000)	Teste da oxidase	Coloração Gram
		Teste do indol	Galerias API 20 E (bioMérieux Corporate)
Enterococos	Enterolert® (IDEXX Laboratories, Inc.)	---	---
	Método baseado na NF EN ISO 7899-2 (Agosto 2000)	Teste da catalase	Coloração Gram
			Galerias API 20 Strep (bioMérieux Corporate)

(---) Não aplicável.

3.4.1. Pesquisa de Coliformes Totais e *Escherichia coli*

3.4.1.1. Enumeração

As análises para enumeração de CT e *E. coli* foram realizadas através da tecnologia IDEXX e da técnica de filtração por membrana.

3.4.1.1.1. Técnica Quanti-Tray® Colilert®

A tecnologia IDEXX (<http://www.idexx.com/water/quantitray/>) consiste na estimativa do Número Mais Provável de bactérias presentes na amostra, após o seu crescimento num substrato definido e incubação a temperatura adequada. O método Colilert® Quanti-Tray® utiliza substratos que são hidrolizados por enzimas específicas das bactérias coliformes e *E. coli* permitindo a sua detecção simultânea. Ao usar este método, o grupo dos Coliformes Totais é definido como todas as bactérias que possuem a enzima β -D-galactosidase, que hidroliza o substrato cromogénico resultando na libertação do cromóforo. *E. coli* é definida como bactéria que dá resultado positivo para coliformes totais e possui a enzima β -glucuronidase, que hidroliza o substrato fluorogénico libertando o fluoróforo (American Public Health Association, 1998).

Os dois nutrientes indicadores orto-nitrofenil- β - α -galactopiranosido (ONPG) e o 4-metil-umbeliferil glucurónido (MUG) são a principal fonte de carbono no substrato usado no método Colilert®. Estes nutrientes são respectivamente metabolizados pela enzima β -galactosidase presentes nos coliformes e pela enzima β -glucuronidase presente em *E. coli*. Ao crescerem os coliformes usam a enzima β -galactosidase para metabolizar o ONPG e a cor do meio muda de incolor para amarelo. *E. coli* usa a enzima β -glucuronidase para metabolizar o MUG o que cria fluorescência na presença de luz ultravioleta (American Public Health Association, 1998 e <http://www.idexx.com/water/>).

Procedimento:

Num frasco de poliestireno estéril de capacidade 100mL é colocada uma dose do substrato definido para Coliformes Totais e *E. coli*, em que o pó constituinte contém apenas os nutrientes ONPG e MUG. Este produto é dissolvido em 100mL de uma

diluição da amostra, normalmente 1:10. Depois de homogeneizada a suspensão é vertida para um tabuleiro de 97 poços (49 grandes e 48 pequenos). O tabuleiro é selado sob vácuo (Sealer Model 2× IDEXX; Westbrook, EUA) e incubado a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 18h. Após a incubação os resultados são lidos directamente do tabuleiro, os poços amarelos são contabilizados como positivos para CT como resultado da degradação do ONPG (Figura 3.1 a)). O tabuleiro é depois exposto a uma lâmpada de luz ultravioleta de 365nm para contagem dos poços com fluorescência brilhante que são considerados positivos para *E. coli* em resultado da degradação do MUG (Figura 3.1 b)). São contados os poços positivos grandes e pequenos para CT e *E. coli* e a partir da tabela do NMP fornecida pelo fabricante, e tendo em consideração o factor de diluição da amostra, é calculado o Número Mais Provável de Coliformes Totais e *E. coli* por 100mL de amostra. Os resultados são expressos em NMP de CT e *E. coli* por 100mL de amostra de água. Não são necessários testes de confirmação ou completos (Edberg, 1990).

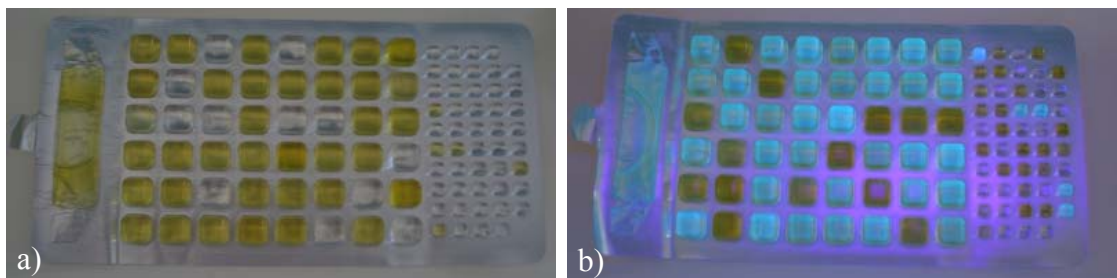


Figura 3.1 – Colilert[®], tabuleiro de substrato definido para Coliformes Totais e *E. coli*. Após incubação a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 18h a) poços amarelos contabilizados como positivos para Coliformes Totais e b) poços fluorescentes à luz ultravioleta contabilizados como positivos para *E. coli*.

3.4.1.1.2. Técnica de filtração por membrana

A técnica da filtração por membrana tem como finalidade a quantificação do número de bactérias após o seu isolamento a partir da amostra de água. Estas

distribuem-se uniformemente na superfície da membrana, o que facilita a sua contagem após a incubação das membranas em meio de cultura e temperatura adequados. Este método foi realizado com base na norma NF EN ISO 9308-1, Setembro 2000 e na Recomendação do IRAR nº05/2005.

Por definição os coliformes são bactérias lactose positiva e oxidase negativa. Dentro dos coliformes a bactéria *Escherichia coli* produz indol a partir de triptofano a $(44.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ em $(21\pm 3)\text{h}$ e/ou hidrolisa o 4-metil umbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) apresentando fluorescência à luz ultravioleta (Recomendação do IRAR nº05/2005).

Procedimento:

As amostras são inicialmente homogeneizadas e posteriormente filtra-se um volume adequado ao tipo de amostra ou sua diluição através de uma membrana de ésteres de celulose com 47mm de diâmetro e poro com diâmetro de $0,45\mu\text{m}$. Após filtração a membrana é colocada à superfície de uma placa de Petri com meio de cultura selectivo; com agar; lactosado e com cloreto de trifenil tetrazólio (TTC) (*Membrane Lauril Sulphate Agar – MLSA*), adequado ao crescimento de bactérias coliformes. As placas de Petri são incubadas a $(36.0\pm 2.0)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$. As colónias típicas que surgem neste meio de cultura são de cor amarela, com alteração da cor do meio de cultura que se torna também amarelo (Figura 3.2). Estas colónias são consideradas como utilizadoras da lactose (lactose positivas). Podem surgir colónias atípicas de cor amarela, laranja, branca ou rosa sem alteração na cor do meio de cultura.

Para a caracterização bioquímica das colónias lactose positivas realizam-se os testes para a presença da enzima oxidase e formação de indol. Idealmente, todas as colónias típicas contabilizadas na membrana devem ser sujeitas a confirmação. Por rotina devem confirmar-se pelo menos dez colónias por placa. Estas são repicadas para

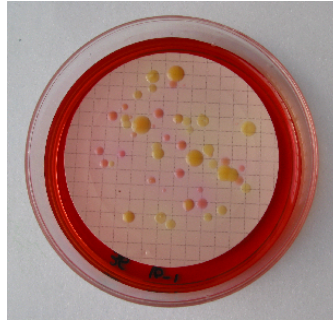


Figura 3.2 – Meio de cultura MLSA selectivo para coliformes totais e *E. coli*. Colónias típicas amarelas e com mudança localizada de cor do meio após incubação a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$. Colónias atípicas: amarelas, laranja, brancas e rosas sem mudança da cor do meio para amarelo.

um meio de cultura gelosado não selectivo – Agar Triptona Soja (TSA) e para um meio de cultura líquido com triptofano Caldo Dev Lactose Peptona – Fluorocult. O meio de cultura TSA é incubado a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$ e o Fluorocult é incubado a $(44.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$. Após a incubação em meio TSA fez-se o teste para determinar a presença da enzima oxidase. As colónias cujo teste da oxidase seja positivo são quantificadas e consideradas como não sendo bactérias coliformes. As colónias cujo teste da oxidase seja negativo são quantificadas como bactérias coliformes e a sua cultura em meio com triptofano é sujeita ao teste da produção de indol. Bactérias oxidase negativas e positivas para a produção de indol são consideradas como *E. coli*.

A partir do número de colónias típicas contadas na membrana, e considerando os resultados dos testes de confirmação calcula-se o número de bactérias CT e *E. coli* presentes em 100mL de amostra. Os resultados são expressos em UFC de CT ou *E. coli* por 100mL de amostra de água.

3.4.1.2. Confirmação

- **Teste da oxidase**

O teste para avaliar a presença da enzima oxidase baseia-se na redução do oxigénio pela enzima citocromo oxidase ao longo da cadeia transportadora de electrões. Como resultado desta reacção observa-se o aparecimento de uma cor azul-escuro resultante da oxidação do reagente da oxidase (N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina) (Madigan, Martinko & Parker, 1997).

Para realizar o teste, deitam-se sobre papel de filtro 2 ou 3 gotas do reagente da oxidase. Com uma ansa de plástico coloca-se uma pequena porção da colónia sub-cultivada em meio TSA sobre o papel de filtro impregnado com o reagente da oxidase. Aguarda-se 30s. O aparecimento da cor azul-escuro é considerado como resultado positivo.

- **Teste do indol**

O teste para avaliar a formação de indol, baseia-se produção deste a partir do triptofano pela acção da triptofanase, resultante na observação de fluorescência sob luz UV 365nm e/ou formação de um anel vermelho à superfície da cultura resultante da reacção do indol com o reagente *Kovac's* (Madigan, Martinko & Parker, 1997).

Para realizar o teste deitam-se duas gotas de reagente *Kovac's* no tubo de cultura de meio Fluorocult. A formação do anel vermelho confirma a produção de indol.

3.4.1.3. Identificação

- **Coloração Gram**

A coloração Gram, permite subdividir as bactérias em dois grandes grupos no que respeita à estrutura e composição da parede bacteriana (Madigan, Martinko & Parker,

1997). Assim, as bactérias designadas Gram positivas (Gram+) possuem uma parede bacteriana com camada espessa de peptidoglicanos ao contrário das Gram negativas (Gram-) que possuem uma camada fina. As bactérias Gram- além de possuírem uma camada fina de peptidoglicanos na parede celular possuem uma membrana externa bilipídica, em que os lípidos e polissacáridos se encontram intimamente ligados formando uma camada externa com uma estrutura muito específica. As bactérias Gram+ não possuem esta membrana externa, daí que durante o procedimento de coloração a sua parede retenha o corante violeta cristal, uma vez que, colapsa após a desidratação pelo álcool. Estas bactérias ficam coradas de violeta. As bactérias Gram- permitem a saída do corante violeta cristal, e são coradas pelo contrastante safranina de cor vermelha (Figura 3.4).

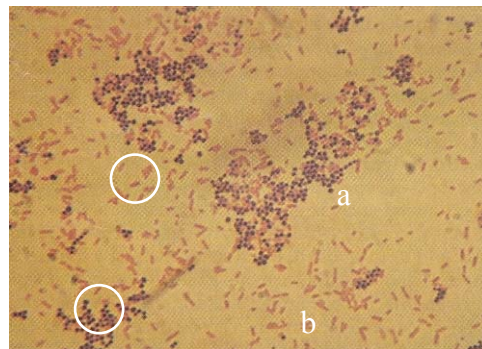


Figura 3.3 – Coloração Gram: a) bactérias Gram+ e b) bactérias Gram- (adaptado de Madigan, Martinko & Parker, 1997).

Procedimento:

As células para a coloração Gram são retiradas de uma cultura fresca com 18 a 24h de crescimento em meio de cultura sólido não selectivo, seguindo os seguintes passos (Madigan, Martinko & Parker, 1997):

1. Secagem e fixação do esfregaço com calor;
2. Imersão do esfregaço no corante violeta cristal durante 1 minuto;
3. Imersão com mordente – iodo – durante 3 minutos;

4. Lavagem com solvente de descoloração – etanol 90%;
5. Lavagem com água;
6. Imersão do esfregaço em contrastante – safranina – durante 1 minuto;
7. Lavagem com água; secagem;
8. Observação ao microscópio óptico utilizando a objectiva de imersão.

- **Galerias API**

As galerias API (<http://www.biomerieux.pt/>) são *kits* de testes bioquímicos específicos, para a identificação dos microrganismos ao nível da espécie, em 4 a 24h. São constituídas por um conjunto de cúpulas com substratos liofilizados, que permitem o estudo específico do metabolismo do microrganismo que se pretende identificar. As actividades metabólicas são avaliadas por mudanças de cor após incubação. Para tal, a colónia a identificar é crescida em meio não selectivo. Após o crescimento prepara-se uma suspensão com densidade óptica segundo as instruções do fabricante. Esta suspensão é então inoculada na galeria. Para determinadas reacções é necessário adicionar reagentes fornecidos com o *kit*. Para outras é necessário criar um ambiente de anaerobiose isolando as cúpulas com parafina líquida estéril. Os resultados dos testes são lidos a partir da galeria com o auxílio de uma tabela fornecida pelo fabricante, resultando da leitura uma chave numérica que corresponde a uma espécie presente na base de dados da respectiva galeria.

Para a identificação das bactérias coliformes foram usadas galerias API 20 E (bioMérieux Corporate), adequadas à identificação de enterobactérias.

Na Tabela 3.IV estão descritos os testes e resultados que devem ser obtidos para a posterior identificação de bactérias coliformes e *E. coli*, através das galerias API.

Tabela 3.IV – Resultados dos testes para confirmação e identificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli*.

Bactérias	Teste Oxidase	Teste Indol	Coloração Gram
Coliformes Totais	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	+	–
Não coliformes	+	---	---

(–) Resultado negativo; (+) Resultado positivo; (---) Não aplicável.

À semelhança do procedimento realizado para a enumeração de CT e *E. coli* através da técnica filtração por membrana com o meio MLSA, foram também usados os meios de cultura AGAR mENDO LES e AGAR mFC (Figura 3.3). Estes são específicos para enumerar CT e CF, respectivamente. Para o meio AGAR mENDO LES cuja incubação é feita a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$, as colónias típicas são vermelhas podendo ter ou não um brilho metálico (característico de *E. coli*) e as atípicas são cor de rosa. Para o meio de cultura AGAR mFC as colónias típicas são azuis e a incubação é feita a $(44.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$.

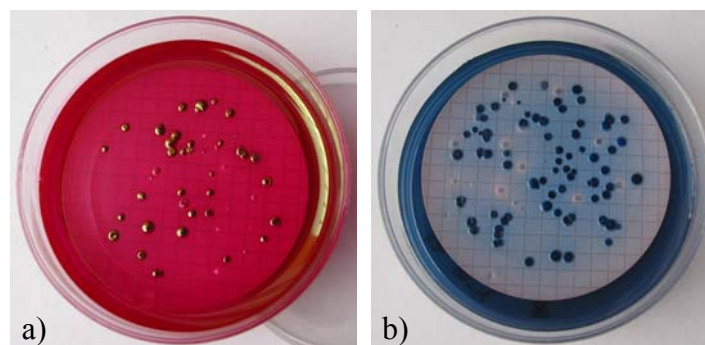


Figura 3.4 – Colónias típicas e atípicas em meios de cultura para enumeração de Coliformes Totais e Coliformes Fecais. a) Meio AGAR mENDO LES, após incubação a $(44.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$ e b) Meio AGAR mFC, após incubação a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante $(21 \pm 3)\text{h}$.

3.4.2. Pesquisa de enterococos

3.4.2.1. Enumeração

A enumeração de enterococos foi, à semelhança da enumeração de bactérias coliformes realizada através da tecnologia IDEXX e da técnica de filtração por membrana, descritas anteriormente.

3.4.2.1.1. Técnica Quanti-Tray[®] Enterolert[®]

A técnica Quanti-Tray[®] Enterolert[®] (<http://www.idexx.com/water/enterolert-e/>) é específica para a detecção de enterococos (<http://www.idexx.com/water/>). Este método utiliza como nutriente o substrato indicador 4-metilumbeliferona- β -D-glucósido, que quando metabolizado pela enzima β -glucosidase presente nos enterococos liberta o grupo fluorocromo. Os derivados metil umbeliferil possuem a vantagem de serem bastante sensíveis e específicos, facilmente detectáveis sob luz UV (365nm) e não serem carcinogénicos (Budnick, Howard & Mayo, 1996).

Procedimento:

Num frasco de poliestireno estéril de capacidade 100mL é colocada uma dose do substrato definido para enterococos. Este produto é dissolvido em 100mL de uma diluição da amostra, normalmente 1:10. Após homogeneização a suspensão é colocada para um tabuleiro de 97 poços (49 grandes e 48 pequenos). O tabuleiro é selado sob vácuo (Sealer Model 2 \times IDEXX; Westbrook, EUA) e incubado a $(41.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Após o período de incubação, os poços positivos para enterococos tornam-se fluorescentes quando expostos à luz ultravioleta (Figura 3.5). Contam-se os poços positivos grandes e pequenos e determina-se o NMP a partir da respectiva tabela

(ANEXO I) e tendo em consideração o factor de diluição da amostra. Os resultados são expressos em NMP de enterococos por 100mL de amostra de água.

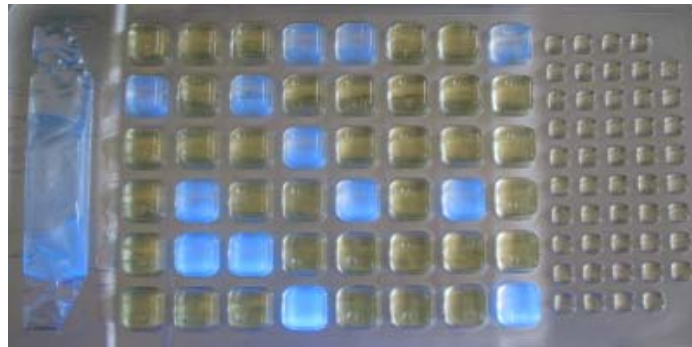


Figura 3.5 – Enterolert[®], tabuleiro de substrato definido para enterococos, após incubação a $(41.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante 24h.

3.4.2.1.2. Técnica de filtração por membrana

Esta técnica é baseada na norma NF EN ISO 7899-2, Agosto 2000.

As colónias de bactérias do género *Enterococcus* que têm reacção positiva à esculina e são catalase negativas podem ser consideradas como enterococos.

Procedimento:

Um volume adequado de amostra ou sua diluição, após homogeneização, é filtrado através de uma membrana de ésteres de celulose com 47mm de diâmetro e poro de $0.45\mu\text{m}$ de diâmetro. Após a filtração da amostra, esta é colocada à superfície de uma placa de Petri com meio de cultura selectivo, sólido, com *Slanetz & Bartley Agar* (S&B), adequado ao crescimento de enterococos certificando-se que não existem bolhas de ar por baixo da membrana. As placas de Petri são incubadas em posição invertida a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante $(44 \pm 4)\text{h}$. As colónias típicas que surgem neste meio de cultura são vermelhas, castanhas ou rosa (Figura 3.6).

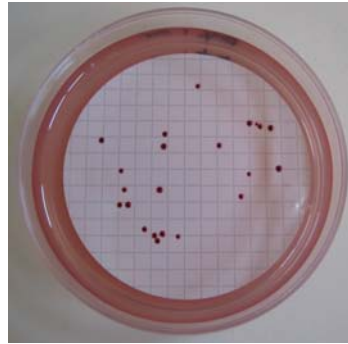


Figura 3.6 – Colónias típicas em meio de cultura selectivo *Slanetz & Bartley* Agar, após incubação a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante (44 ± 4) h.

A confirmação das colónias típicas é feita no meio de cultura Agar BÍlis Esculina Azida (BEAA). A membrana é colocada na posição invertida numa placa de Petri com o meio que tem na sua constituição os agentes selectivos esculina e azida. A placa é incubada a $(44.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante 2-24h. A hidrólise da esculina a glucose e esculetina na presença de bÍlis resulta no enegrecimento do meio de cultura. BactÉrias positivas para esculina são contabilizadas como pertencentes ao género *Enterococcus* (Figura 3.7). Em complemento, realiza-se o teste da catalase que revela a presença ou não desta enzima que catalisa a decomposição de perÓxido de hidrogénio com libertação de oxigénio (Norma NF EN ISO 7899-2, Agosto 2000).

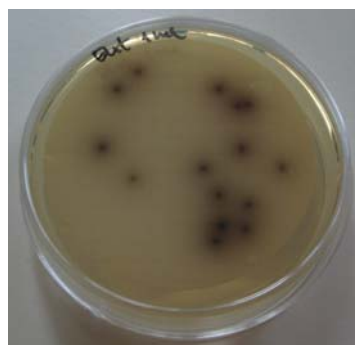


Figura 3.7 – Colónias do género *Enterococcus* em meio Agar BÍlis Esculina Azida, com reacção positiva para a esculina após incubação a $(44.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante 24h.

3.4.2.2. Confirmação

- **Teste da catalase**

O teste para avaliar a presença da enzima catalase consiste na redução do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio que se liberta sob a forma de bolhas (Madigan, Martinko & Parker, 1997).

Para realizar o teste, deita-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% numa lâmina de vidro. Com uma ansa de plástico retira-se parte da colónia que se coloca em contacto com o reagente. Se ocorrer formação de bolhas de gás o teste é considerado positivo.

3.4.2.3. Identificação

- **Coloração Gram**

Para enterococos o resultado desta coloração (já descrita anteriormente) deverá ser a observação de células coradas de violeta, ou seja, bactérias Gram+ (Madigan, Martinko & Parker, 1997).

- **Galerias API**

As galerias API 20 Strep (bioMérieux Corporate), foram usadas para a identificação de enterococos, uma vez que, são as adequadas à identificação deste grupo de bactérias (<http://www.biomerieux.pt/>) (Figura 3.8).



Figura 3.8 – Galeria API 20 Strep (bioMérieux Corporate) para identificação de bactérias do grupo enterococos, após incubação a $(36.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ durante 24h.

Na Tabela 3.V estão descritos os testes e resultados que devem ser obtidos para a posterior identificação de bactérias do género *Enterococcus*, através das galerias API.

Tabela 3.V – Resultados de testes para confirmação e identificação de enterococos.

Bactérias	Teste catalase	Coloração Gram
Enterococos	-	+
Não Enterococos	+	---

(-) Resultado negativo; (+) Resultado positivo; (---) Não aplicável.

Controlo da qualidade

Todos os reagentes utilizados incluindo os meios de cultura, estavam devidamente identificados e armazenados de acordo com as especificações do fornecedor. Antes de utilizar qualquer produto foi verificado o prazo de validade assim como, o seu aspecto para garantir que as suas propriedades não se encontravam alteradas. Os meios de cultura foram preparados, esterilizados, utilizados e armazenados de acordo com as instruções do fabricante e as indicações das normas. Cada lote de meios foi previamente testado para garantir a capacidade de desenvolvimento dos microrganismos específicos, e também para garantir a supressão do crescimento de microrganismos não alvo. Foram também realizadas análises de Materiais de Referência Certificados, para garantir a exactidão do método normalizado filtração por membrana para os parâmetros *Escherichia coli* (NCTC 9001- HPA) e *Enterococcus faecalis* (NCTC 775- HPA).

3.4.3. Análises físico-químicas

3.4.3.1. Determinação de pH

O valor de pH das amostras foi determinado por potenciometria através do medidor de pH Crison GLP22.

3.4.3.2. Determinação de salinidade

O valor de salinidade (gNaCl.L^{-1}) foi determinado por condutivimetria com o condutivímetro Crison GLP32.

3.4.4. Análise estatística

A análise estatística é usada para extrair o máximo de informação dos dados recolhidos, assim como, para compreender melhor as situações que esses mesmos dados representam. A organização dos dados resultantes das análises e os tratamentos estatísticos foram realizados no *software* SPSS versão 15.0.

3.4.4.1. Testes estatísticos

É possível através da aplicação de determinados testes estatísticos verificar se os resultados obtidos a partir de uma determinada experiência ou estudo estão de acordo com considerações teóricas ou hipóteses colocadas, ou se demonstram o contrário. Num teste estatístico deste tipo os principais passos são: (i) formular a hipótese estatística a ser testada, normalmente chamada hipótese nula – H_0 . Esta hipótese expressa o conceito de igualdade (inexistência de diferenças). Define-se também uma hipótese alternativa – H_1 , geralmente sob a forma de complementar da H_0 , e contra a qual esta é testada. (ii) Decidir o nível de significância (α) para o teste, ou seja, a probabilidade de rejeitar a H_0 se esta for realmente verdadeira. (iii) Definir uma estatística de teste a aplicar aos resultados obtidos e determinar os valores críticos. (iv) Calcular os resultados através da aplicação do teste estatístico e tomar as decisões de acordo com as regras estabelecidas (Lightfoot & Maier, 2003).

3.4.4.1.1. Comparação entre amostras emparelhadas

Neste trabalho foi feita a análise, em paralelo, de amostras através do recurso a dois métodos diferentes. O teste adequado a esta situação é o teste para pares, fazendo-se uma comparação entre amostras emparelhadas. A H_0 a testar é a igualdade das médias de ambos os métodos para as amostras analisadas e a H_1 o contrário, ou seja, a diferença das médias dos métodos em estudo. O nível de risco ou significância escolhido foi de 5%. Antes do tratamento estatístico foi feita a conversão dos resultados em logaritmo de base 10 (log), para assim garantir que a distribuição dos resultados é aproximada à distribuição Normal, e possibilitar a aplicação da estatística de teste para amostras emparelhadas, t de *Student*.

3.4.4.1.2. Análise de variância – ANOVA

As técnicas de análise estatística denominadas análise de variância (ANOVA) pretendem comparar diferentes grupos de dados, de modo a verificar se pertencem a uma mesma população. A ideia é testar o efeito que diferentes tratamentos ou métodos têm no factor em estudo. Para usar este tipo de teste pressupõem-se que os dados têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias.

Neste trabalho, a ANOVA a um factor foi usada para comparar o efeito de diferentes meios de cultura na enumeração dos microrganismos para os quais são selectivos.

3.4.4.2. Norma ISO 17994:2004 para avaliação da equivalência entre métodos microbiológicos

A norma ISO 17994:2004 descreve os critérios e procedimentos a seguir para estabelecer a equivalência entre dois métodos de análises microbiológicas, em que um

deles pode ser um método de referência, não sendo esta uma condição obrigatória. Os métodos a analisar podem ser métodos baseados em contagem de colónias, ou métodos de estimativa do NMP como a FTM e métodos de presença-ausência. Igual volume da amostra i retirado do mesmo frasco de amostragem é analisado através dos dois métodos em estudo, a e b . A avaliação da comparação dos métodos é feita com base num intervalo de confiança determinado para a incerteza expandida em torno da média da diferença relativa. A diferença relativa (x_i) determina-se a partir dos pares de resultados obtidos (a_i, b_i) da seguinte forma:

$$x_i = [\ln(a_i) - \ln(b_i)] \times 100\%$$

Em que: a_i é o resultado obtido para a amostra i através do método em estudo a ;
 b_i é o resultado obtido para a amostra i através do método b assumido como referência.

As amostras em que ambos os métodos dão um resultado zero após confirmação (0,0) deverão ser excluídas da análise. Para não excluir amostras em que um dos métodos dá resultado igual a zero, a norma estabelece que o cálculo da diferença relativa deverá ser feito da seguinte forma:

$$\begin{array}{ll} \text{Se o resultado for } (a_i, 0) & x_i = \ln(a_i+1) \times 100\% \\ \text{Se o resultado for } (0, b_i) & x_i = -\ln(b_i+1) \times 100\% \end{array}$$

A média das diferenças relativas de todas as amostras dá-nos o valor da diferença média relativa:

$$\bar{x} = \sum x_i / n$$

Em que: x_i é a diferença relativa na amostra i ;
 n é o número de amostras.

A incerteza expandida (U) é determinada da seguinte forma:

$$U = ks/\sqrt{n}$$

Em que: k é igual a 2 para um intervalo de confiança de 95%;

s é o desvio-padrão da diferença média relativa;
 n é o número de amostras.

O intervalo de confiança é determinado da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \text{Limite inferior:} & \quad x_I = \bar{x} - U \\ \text{Limite superior:} & \quad x_S = \bar{x} + U \end{aligned}$$

Os métodos são considerados “não diferentes” se a diferença média relativa não for significativamente diferente de zero e a incerteza expandida não se afastar do nível estabelecido para o desvio máximo aceitável, ou seja:

$$-D \leq x_I \leq 0 \quad \text{e} \quad 0 \leq x_S \leq +D$$

Em que D é o desvio máximo aceitável para o intervalo de confiança, e a norma sugere que se estabeleça o valor de 10% para estudos de desempenho de métodos a nível internacional ou inter-laboratorial em águas para consumo.

Os métodos são considerados “diferentes” se:

$$x_I > 0 \quad \text{ou} \quad x_S < 0$$

Os resultados são considerados “inconclusivos” se:

$$x_I < -D \quad \text{e} \quad x_S > 0 \quad \text{ou} \quad x_I < 0 \quad \text{e} \quad x_S > +D$$

Neste caso a norma recomenda que sejam analisadas mais amostras, cujo número deve ser estimado a partir de:

$$n = 4 (s/y)^2$$

Em que: n é o número de amostras;
 s é o desvio-padrão da diferença média relativa;
 y é o maior valor de dois:

$$\begin{aligned} y_1 &= \bar{x} \\ y_2 &= |\bar{x}| - |D| \end{aligned}$$

\bar{x} é a média aritmética da diferença relativa, em unidades de %;
 D é o desvio máximo aceitável (10%) da incerteza expandida ao valor zero no caso de os métodos serem “não diferentes”, em unidades de %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de filtração por membrana é a mais usada por rotina em laboratórios para a enumeração de bactérias coliformes e enterococos em amostras de água. Foram já realizados vários estudos para comparar esta técnica com os testes enzimáticos disponíveis no mercado Colilert[®] e Enterolert[®], específicos para enumeração de Coliformes Totais e enterococos, respectivamente. Com o objectivo de comparar os dois métodos na enumeração de Coliformes Totais, *Escherichia coli* e enterococos em diferentes tipos de águas, amostras de águas para consumo, águas naturais, águas residuais tratadas, foram analisadas por diversos autores.

As directivas europeias decretam que todos os estados membros devem usar os métodos normalizados para as análises de águas (Norma NF EN ISO 9308-1, Setembro 2000 para *E. coli* e Norma NF EN ISO 7899-2, Agosto 2000 para Enterococos Intestinais), a não ser que se demonstre que outros métodos sejam equivalentes para analisar este tipo de amostras. Foi nesse sentido que surgiram trabalhos descrevendo as vantagens que os testes de substrato definido possuem em relação aos métodos de referência na avaliação da qualidade microbiológica dos diferentes tipos de águas.

4.1. Enumeração de Coliformes Totais, *Escherichia coli* e enterococos

Para enumeração de bactérias Coliformes Totais e *E. coli* foram analisadas 40 amostras de águas naturais de zonas costeiras e de transição. Para a enumeração de enterococos foi analisado um total de 44 amostras de águas dos referidos tipos. Todas as amostras foram analisadas em paralelo através dos métodos normalizados filtração por membrana segundo as respectivas normas, e através da tecnologia IDEXX segundo as instruções do fabricante. Os resultados das análises realizadas encontram-se representados nos gráficos 4.1, 4.2 e 4.3 sob a forma de log de modo a, tornar possível a

representação de todas as amostras num só gráfico e a realizar o tratamento estatístico posterior. Também se encontram representados nos gráficos os resultados das análises realizadas com meios de cultura selectivos diferentes dos estabelecidos pelas normas. Nas Figuras 4.2 e 4.3, encontram-se também representados os resultados obtidos para as duas análises realizadas com Materiais de Referência Certificados (MRC), amostras 41 e 42 para *Escherichia coli* (NCTC 9001- HPA) e amostras 45 e 46 para *Enterococcus faecalis* (NCTC 775- HPA), respectivamente. Estas análises foram realizadas para verificar a exactidão do método de filtração por membrana, que revelou uma boa correspondência dentro do intervalo de confiança associado a estes MRC: $(3.31 \times 10^4 - 3.99 \times 10^4)$ UFC.100mL⁻¹ para *E. coli*, e $(1.24 \times 10^3 - 1.54 \times 10^3)$ UFC.100mL⁻¹ para *Enterococcus faecalis*. O valor médio para *E. coli* era de 3.66×10^4 UFC.100mL⁻¹ e nas análises 41 e 42 foram obtidos os valores médios 3.40×10^4 e 3.30×10^4 UFC.100mL⁻¹, respectivamente. Para *Enterococcus faecalis* o valor médio era de 1.44×10^3 UFC.100mL⁻¹ e os resultados obtidos para as amostras 45 e 46 foram: 1.97×10^3 e 2.33×10^3 UFC.100mL⁻¹, respectivamente. Estas análises estão incluídas no tratamento estatístico realizado com vista à comparação dos métodos em estudo.

4.2. Determinação dos parâmetros físico-químicos pH e salinidade

Neste estudo, foram determinados os parâmetros físico-químicos pH e salinidade (gNaCl.L⁻¹) para todas as amostras analisadas. Os valores de pH e salinidade mínimos, máximos e médios obtidos encontram-se na Tabela 4.I. É importante medir estes parâmetros uma vez que, a pesquisa dos microrganismos indicadores se baseia em reacções metabólicas (métodos normalizados filtração por membrana) e em actividades enzimáticas (testes rápidos da tecnologia IDEXX), que dependem das condições fisiológicas das bactérias. Alterações nas condições de irradiação, temperatura,

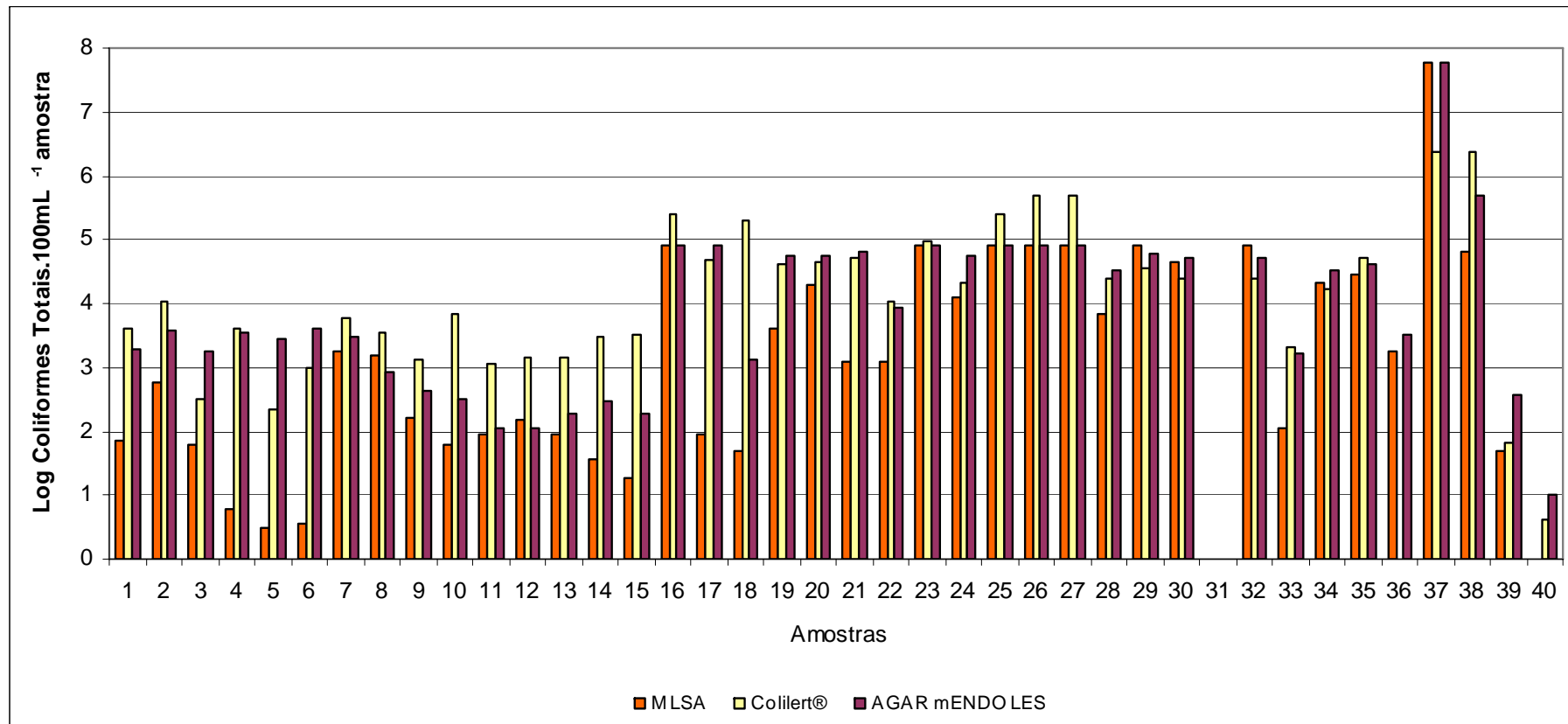


Figura 4.1 – Enumeração de bactérias Coliformes Totais, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura MLSA e AGAR mENDO LES e pelo teste enzimático Colilert®.

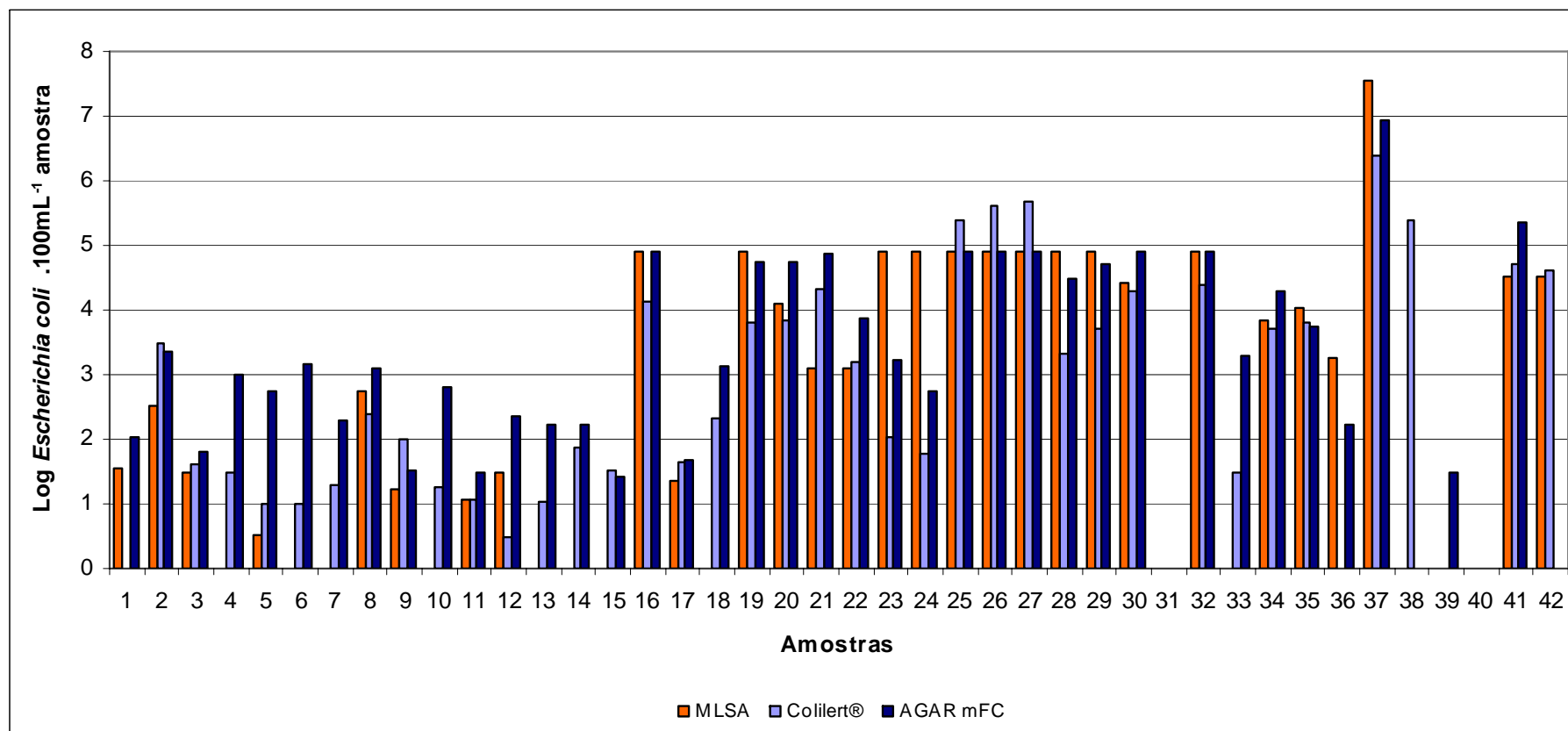


Figura 4.2 – Enumeração de *Escherichia coli*, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura MLSA e AGAR mFC e pelo teste enzimático Colilert®. A linha vermelha indica o limite máximo estabelecido pela directiva 2006/7/CE para *E. coli* para águas costeiras e de transição consideradas “boa” qualidade.

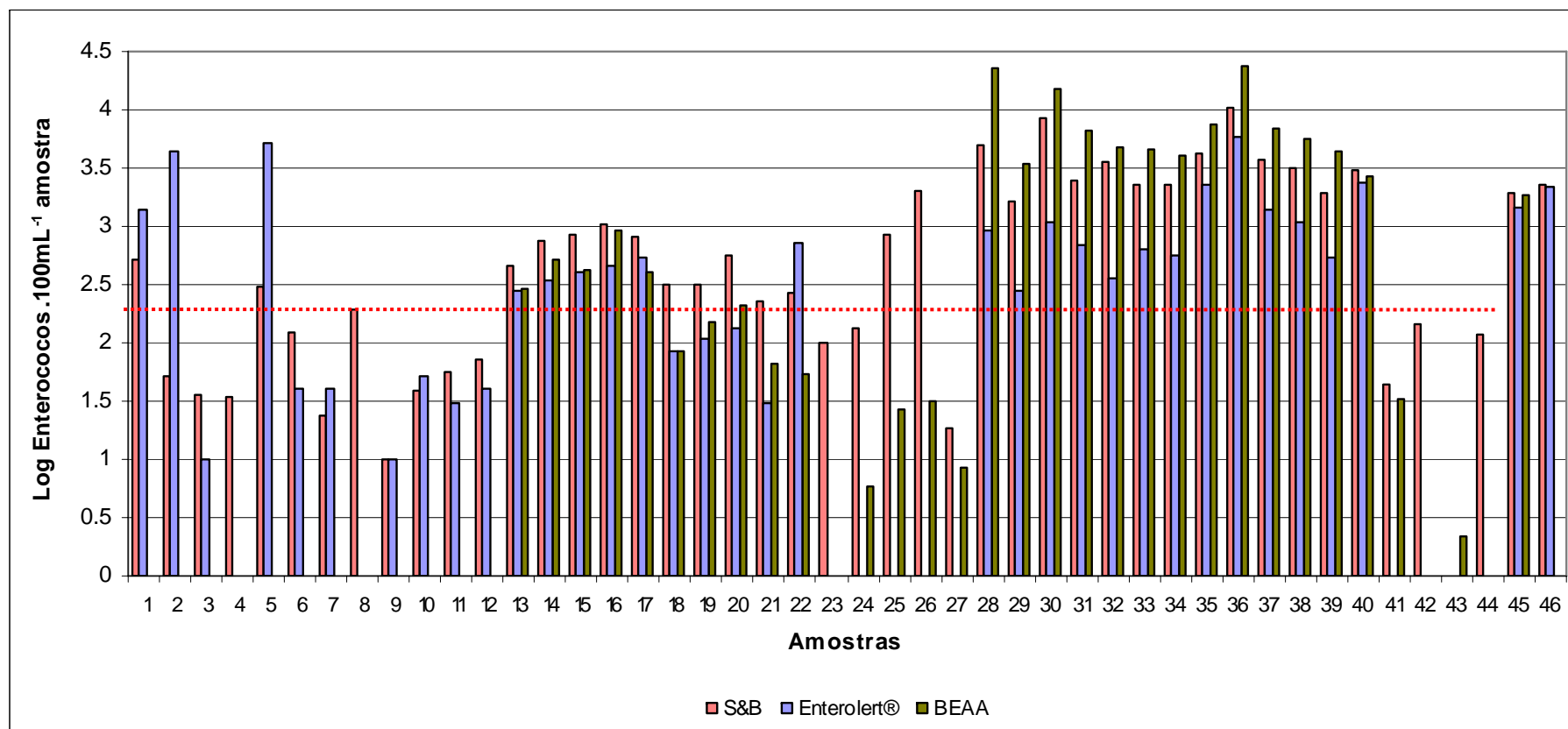


Figura 4.3 – Enumeração de enterococcos, pelo método filtração por membrana com os meios de cultura S&B e BEAA e pelo teste enzimático Enterolert®. A linha vermelha indica o limite máximo estabelecido pela directiva 2006/7/CE para Enterococcos Intestinais para águas costeiras e de transição consideradas de “boa” qualidade.

salinidade e concentração de nutrientes no meio ambiente, podem causar situações de stress às bactérias e dificultar a sua recuperação e enumeração nos meios de cultura (Fiksdal *et al.*, 1994).

Tabela 4.I – Valores de pH e salinidade obtidos para o total de amostras analisadas.

Amostras para pesquisa de:	n	pH			Salinidade (gNaCl.L ⁻¹)		
		Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo	Médio
Coliformes Totais	40	6.94	8.00	7.61	0.43	1.00	0.66
Enterococos	44	7.23	8.38	8.02	0.28	33.80	26.87

4.3. Correlação entre os parâmetros microbiológicos e físico-químicos

Para perceber como se relacionam os parâmetros microbiológicos Coliformes Totais, *Escherichia coli* e enterococos enumerados pelos diferentes métodos, com os parâmetros físico-químicos pH e salinidade determinaram-se matrizes de correlação. O valor de significância é o valor ρ associado ao coeficiente de correlação da população, e em cuja hipótese nula é $H_0: \rho = 0$ e a hipótese alternativa é $H_1: \rho \neq 0$.

Na Tabela 4.II encontram-se os resultados da matriz de correlação estabelecida entre os métodos de enumeração de bactérias coliformes e os parâmetros físico-químicos pH e salinidade (gNaCl.L⁻¹). Dos valores de correlação obtidos entre os meios de cultura MLSA e AGAR mENDO LES e o teste Colilert[®], podemos concluir que estes apresentaram uma correlação positiva (0.725 e 0.724, respectivamente) altamente significativa para um nível ρ de 0.01. Em relação ao parâmetro valor de pH, entre este e os diferentes meios de cultura não existe correlação. A salinidade apresentou, uma correlação negativa significativa (-0.386) para um nível ρ de 0.05 com o meio de cultura

AGAR mENDO LES e uma correlação negativa (-0.421) significativa para um nível ρ de 0.01 com o teste Colilert[®].

Tabela 4.II – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de Coliformes Totais e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.

		pH	Salinidade	CTMLSA	CTmENDOLES	CTColilert
pH	Pearson Correlation	1	-.191	.016	-.111	-.082
	Sig. (2-tailed)		.238	.924	.497	.615
	N	40	40	40	40	40
Salinidade	Pearson Correlation	-.191	1	-.311	-.386(*)	-.421(**)
	Sig. (2-tailed)	.238		.051	.014	.007
	N	40	40	40	40	40
CTMLSA	Pearson Correlation	.016	-.311	1	.753(**)	.725(**)
	Sig. (2-tailed)	.924	.051		.000	.000
	N	40	40	40	40	40
CTmENDOLES	Pearson Correlation	-.111	-.386(*)	.753(**)	1	.724(**)
	Sig. (2-tailed)	.497	.014	.000		.000
	N	40	40	40	40	40
CTColilert	Pearson Correlation	-.082	-.421(**)	.725(**)	.724(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.615	.007	.000	.000	
	N	40	40	40	40	40

* Correlação significativa para um nível de 0.05 (bilateral).

** Correlação significativa para um nível de 0.01 (bilateral).

A correlação estabelecida entre os métodos de enumeração de *E. coli* e os parâmetros físico-químicos está representada na Tabela 4.III. Entre o valor de pH e os meios de cultura não existe correlação. Entre a salinidade e o meio de cultura AGAR mFC existe uma correlação negativa significativa (-0.365) para um nível ρ de 0.05. Entre os dois meios de cultura MLSA e AGAR mFC e o teste enzimático Colilert[®] a correlação é positiva (0.716 e 0.738, respectivamente) significativa para um nível ρ de 0.01.

Na Tabela 4.IV, encontram-se os resultados obtidos na matriz de correlação entre os métodos usados para a enumeração de enterococos e os parâmetros pH e salinidade. Dos valores obtidos verificou-se que para a maioria das relações analisadas existe correlação significativa para um risco de nível ρ de 0.01. Apenas a correlação

entre o meio de cultura BEAA e a salinidade apresentou um valor negativo (-0.395) significativo para um nível de risco p de 0.05.

Tabela 4.III – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de *Escherichia coli* e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.

		pH	Salinidade	EcoliMLSA	EcolimFC	EcoliColilert
pH	Pearson Correlation	1	-.191	-.138	-.217	-.114
	Sig. (2-tailed)		.238	.394	.179	.485
	N	40	40	40	40	40
Salinidade	Pearson Correlation	-.191	1	-.237	-.365(*)	-.304
	Sig. (2-tailed)	.238		.141	.021	.057
	N	40	40	40	40	40
EcoliMLSA	Pearson Correlation	-.138	-.237	1	.806(**)	.716(**)
	Sig. (2-tailed)	.394	.141		.000	.000
	N	40	40	40	40	40
EcolimFC	Pearson Correlation	-.217	-.365(*)	.806(**)	1	.738(**)
	Sig. (2-tailed)	.179	.021	.000		.000
	N	40	40	40	40	40
EcoliColilert	Pearson Correlation	-.114	-.304	.716(**)	.738(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.485	.057	.000	.000	
	N	40	40	40	40	40

* Correlação significativa para um nível de 0.05 (bilateral).

** Correlação significativa para um nível de 0.01 (bilateral).

Tabela 4.IV – Matriz de correlação. Métodos de enumeração de enterococos e parâmetros físico-químicos valor de pH e salinidade.

		pH	Salinidade	SEB	BEAA	Enterolert
pH	Pearson Correlation	1	.539(**)	-.730(**)	-.890(**)	-.685(**)
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000	.000
	N	44	44	44	32	43
Salinidade	Pearson Correlation	.539(**)	1	-.415(**)	-.395(*)	-.265
	Sig. (2-tailed)	.000		.005	.025	.085
	N	44	44	44	32	43
SEB	Pearson Correlation	-.730(**)	-.415(**)	1	.839(**)	.611(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.005		.000	.000
	N	44	44	44	32	43
BEAA	Pearson Correlation	-.890(**)	-.395(*)	.839(**)	1	.894(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.025	.000		.000
	N	32	32	32	32	31
Enterolert	Pearson Correlation	-.685(**)	-.265	.611(**)	.894(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.085	.000	.000	
	N	43	43	43	31	43

* Correlação significativa para um nível de 0.05 (bilateral).

** Correlação significativa para um nível de 0.01 (bilateral).

4.4. Apreciação da qualidade das amostras de águas para fins recreativos

Com base nas enumerações obtidas para as amostras de águas para fins recreativos analisadas, determinou-se a percentagem de amostras que estavam em conformidade e acima dos valores máximos recomendados pela Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho para águas de “boa” qualidade quando analisadas através do método da filtração por membrana (Tabela 4.V). De salientar, o facto de uma elevada percentagem das amostras analisadas revelarem enumerações de microrganismos indicadores de contaminação fecal acima dos limites estabelecidos na Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. Esta directiva estabelece um valor para *E. coli* de 500UFC.100mL⁻¹ de amostra de água, para águas costeiras e de transição de “boa” qualidade analisadas através do método descrito na norma ISO 9308-1. Relativamente a *E. coli* 47.5% das amostras apresentaram valores acima desse limite.

Tabela 4.V – Apreciação da qualidade das amostras de águas para fins recreativos com base na enumeração de *Escherichia coli* e enterococos, pelos métodos em estudo.

Bactérias	Método	Em conformidade com o critério estabelecido pela directiva 2006/7/CE para águas costeiras e de transição de “boa” qualidade		Acima do limite estabelecido pela directiva 2006/7/CE para águas costeiras e de transição de “boa” qualidade	
		n	%	n	%
<i>Escherichia coli</i>	Normalizado (FM) ISO 9308-1:2000	40	52.5	40	47.5
	IDEXX (Colilert®)		57.5		42.5
Enterococos	Normalizado (FM) ISO 7899-2:2000	44	38.6	44	61.4
	IDEXX (Enterolert®)		50.0		50.0

A enumeração de enterococos demonstrou que, 61.4% das amostras analisadas pelo método normalizado ISO 7899-2:2000, ultrapassou o limite de 200UFC.100mL⁻¹ de

amostra estabelecido pela directiva 2006/7/CE para águas costeiras e de transição de “boa” qualidade.

4.5. Comparação entre o método normalizado filtração por membrana e a tecnologia IDEXX

4.5.1. Coliformes Totais

Em 82.5% das amostras de água analisadas para a enumeração de Coliformes Totais obteve-se um maior número destas bactérias através da enumeração pelo teste rápido Colilert® em comparação com o método normalizado, filtração por membrana, com o meio de cultura selectivo MLSA (Recomendação do IRAR nº05/2005) (ANEXO II). No entanto, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas para um grau de confiança de 95% ($p < 0.05$) num teste *t* de *Student* para comparação de médias para amostras emparelhadas. O que levaria à possibilidade de os métodos serem equivalentes, uma vez que, a hipótese nula colocada foi a de equivalência dos métodos, não foi rejeitada.

Segundo a norma ISO 17994:2004, que estabelece os critérios de equivalência entre métodos de análises microbiológicas para a qualidade da água, existe uma diferença significativa entre os métodos. Uma vez que, o intervalo determinado para a avaliação da equivalência dos métodos ($x_I; x_S$) foi de (108.9;287.6)%, positivo no limite inferior e superior, a diferença entre os métodos está a favor do teste rápido em detrimento do método normalizado.

Num ensaio inter-laboratorial publicado em 2006 por Ribas e seus colaboradores, também se chegou à conclusão através do tratamento dos resultados segundo a norma ISO 17994:2004, que os métodos parecem ser significativamente diferentes, e que o teste enzimático apresenta resultados mais significativos que o método de referência.

Este estudo foi realizado em amostras de águas naturais superficiais e subterrâneas (Ribas *et al.*, 2006).

Os autores Fricker e colaboradores em 1997, De Roubin e colaboradores em 1997 e Eckner em 1998, analisaram amostras de águas para consumo humano através da enumeração de CT e *E. coli*. As amostras foram processadas em paralelo através do método normalizado filtração por membrana, e do teste enzimático Colilert[®]. Os estudos realizados pelos três grupos de investigadores indicaram que o teste enzimático apresentou uma maior capacidade de recuperação de coliformes que o método normalizado. Num estudo de 2002, Schets e colaboradores analisaram amostras de águas de superfície, águas para consumo humano e águas para consumo artificialmente contaminadas com água de superfície. Neste trabalho, o teste enzimático Colilert[®] foi comparado com o método de filtração por membrana e os autores concluíram que o teste Colilert[®] poderia ser usado para analisar todos os tipos de águas. Chao e colaboradores, em 2003, realizaram um estudo para comparar o teste Colilert[®] com o método normalizado filtração por membrana, para enumeração de CT e *E. coli*. Analisaram águas fluviais, águas subterrâneas e águas de nascentes.

A enumeração de coliformes e *E. coli* pelo teste Colilert[®] revelou ser igual ou superior à obtida pelo método normalizado, consoante o tipo de água. Niemelä e colaboradores em 2003 noutro estudo de comparação entre o teste enzimático Colilert[®] e o método normalizado de filtração por membrana, analisaram amostras de águas de vários tipos para enumeração de coliformes totais e *E. coli*. Como resultado deste trabalho, os autores obtiveram uma maior concentração de coliformes pelo método enzimático que pelo método referência, em que a diferença encontrada foi estatisticamente significativa.

As diferenças obtidas entre os dois métodos em estudo poderão ser explicadas com base na diferença da composição dos meios de cultura e substratos que estes métodos empregam, o que pode resultar na detecção de dois grupos diferentes de bactérias coliformes. Os coliformes que crescem em meio sólido necessitam de duas enzimas para fermentar a lactose: a β -galactosidase-permease, que transporta a lactose para dentro das células bacterianas; e a β -galactosidase que permite a utilização da lactose com a produção de ácido e gás. Os genes que codificam para estas enzimas são o *lacY* e o *lacZ*, respectivamente. Os coliformes que não possuam o gene *lacY* não formam colónias amarelas em meio sólido que contem lactose, a não ser que esta exista em concentrações elevadas. Quando o gene *lacZ* está presente na célula bacteriana, o substrato ONPG pode ser usado, mesmo que as bactérias não possuam o *lacY*. Bactérias coliformes que possuam ambos os genes podem usar a lactose e o substrato ONPG.

No trabalho realizado por Schets e colaboradores em 2001, foi também enumerado um número superior de bactérias coliformes pelo método rápido que pela técnica de filtração por membrana. A explicação que encontraram para estes resultados foi a existência de uma população maior de coliformes que possuem apenas o gene *lacZ*, resultando em contagens mais elevadas para o teste Colilert[®].

No trabalho de Fricker em 1997 cerca de 10% das bactérias coliformes isoladas de água para consumo humano não fermentavam a lactose, devido à ausência da enzima β -galactosidase-permease.

Outra explicação para o facto de serem enumeradas menos bactérias coliformes pela técnica de filtração por membrana poderá ser o efeito competitivo devido ao crescimento excessivo de microrganismos que não são alvo de pesquisa, impedindo o desenvolvimento das colónias típicas. Este tipo de situação é comum em amostras de águas residuais, e acontece não só com o meio de cultura MLSA, mas também com o

Tergitol (Toze *et al.*, 1990; Toze *et al.*, 1994; Niemi *et al.*, 2001 e Schets *et al.*, 2001). Outro aspecto importante que já foi demonstrado e que se deve ter em consideração é o facto do teste Colilert[®] enumerar como coliformes totais *Aeromonas* sp. um organismo presente em meios aquáticos, sobrestimando assim o número de CT presente nas amostras (Landre, Gavriel, & Lamb, 1998).

4.5.2. *Escherichia coli*

Nos resultados obtidos para a enumeração de *E. coli*, em 54.8% das amostras analisadas o teste Colilert[®] revelou enumerações superiores à técnica da filtração por membrana (ANEXO III). Por outro lado, para 39.1% os resultados do método de filtração por membrana foi superior aos do teste rápido. O tratamento estatístico dos resultados através do teste *t* de *Student* revelou que as diferenças observadas não são significativas para um intervalo de confiança de 95%. Isto indica que para este parâmetro os métodos poderão ser equivalentes, uma vez que, não se rejeita a hipótese nula de equivalência dos métodos.

Um resultado inconclusivo foi obtido aquando da análise dos resultados através do tratamento estatístico recomendado pela norma ISO 17994:2004. O intervalo determinado foi de (-79.2;154.0)%, revelando a necessidade de analisar um maior número de amostras, uma vez que, o limite inferior é menor que $-D$ (10%) e o limite superior determinado é maior que zero. No estudo inter-laboratorial realizado pelos autores Ribas e colaboradores, publicado em 2006, os resultados de avaliação da equivalência entre o método normalizado e o teste Colilert[®], revelaram diferenças entre os dois métodos, a favor do método de referência.

Os autores Fricker e colaboradores em 1997, De Roubin e colaboradores em 1997 e Eckner em 1998, demonstraram para amostras de água para consumo humano, a

equivalência dos métodos para o parâmetro *E. coli*. Estes autores concluíram que não existe diferença significativa entre a técnica de filtração por membrana e o teste Colilert[®] na enumeração destas bactérias neste tipo de águas. Embora tenham observado uma maior recuperação de *E. coli* no teste enzimático Colilert[®] que na técnica de filtração por membrana.

Num estudo realizado por Buckalew e colaboradores publicado em 2006, para a avaliação da qualidade da água através da enumeração de coliformes fecais foram analisadas amostras de águas naturais por laboratórios certificados. Neste estudo também foram aplicados em paralelo o método de filtração por membrana e o teste Colilert[®], sendo idênticas as técnicas de colheita e preservação das amostras. O teste enzimático Colilert[®] produziu resultados comparáveis aos da filtração por membrana, revelando uma equivalência entre os dois métodos. Águas balneares foram estudadas por Eckner em 1998, num trabalho realizado para comparar os testes enzimáticos Colilert[®] e Enterolert[®] com o método normalizado de filtração por membrana. Os resultados obtidos demonstraram não existir diferenças significativas para a enumeração de *E. coli* através dos métodos, normalizado e enzimático. Chihara e colaboradores, em 2005 analisaram em paralelo amostras de águas residuais através dos métodos filtração por membrana e o teste enzimático Colilert[®]. Foram enumerados coliformes fecais e *E. coli* em amostras de águas residuais tratadas de suiniculturas e águas residuais municipais. Para a detecção de coliformes fecais o teste Colilert[®] foi ligeiramente modificado, sujeitando-se inicialmente os tabuleiros a uma incubação de 4 horas a 37°C, só depois a incubação a passou a 44.5°C durante 20 horas. As diferenças encontradas para todas as amostras foram inferiores a uma ordem de magnitude. E os resultados mostraram uma correlação significativa entre o teste Colilert[®] e o método normalizado. Segundo estes investigadores, apesar do teste Colilert[®] ter revelado uma menor

recuperação de bactérias que o método de filtração por membrana, este teste poderá ser usado para a quantificação de bactérias coliformes fecais e *E. coli* em águas residuais municipais e de agricultura. Os autores Niemelä e colaboradores analisaram em 2003, amostras de águas de vários tipos para comparação entre o teste enzimático Colilert[®] e o método normalizado de filtração por membrana, na enumeração de coliformes totais e *E. coli*. Como resultado deste trabalho, estes autores obtiveram uma maior enumeração de coliformes pelo método enzimático que pelo método referência, e uma enumeração de *E. coli* equivalente em ambos os métodos. A diferença encontrada foi estatisticamente significativa. Chao e colaboradores em 2003, realizaram um estudo para comparar o teste Colilert[®] com o método normalizado de filtração por membrana para enumeração de coliformes totais e *E. coli*. Analisaram águas fluviais, águas subterrâneas e águas de nascentes. A enumeração de *E. coli* pelo teste Colilert[®] revelou ser igual ou superior à obtida pelo método normalizado, consoante o tipo de água.

4.5.3. Enterococos

O teste Enterolert[®] apresentou para o parâmetro enterococos valores superiores aos obtidos pela técnica da filtração por membrana em 13.0% das amostras (ANEXO IV). Uma enumeração superior foi obtida através do método de FM em 82.6% das amostras analisadas. O teste estatístico *t* de *Student* para amostras emparelhadas e para uma significância de 5% indicou, que os métodos não são equivalentes. A mesma conclusão foi tirada da análise segundo a norma ISO 17994:2004, em que o intervalo calculado para avaliar a equivalência dos métodos é negativo para ambos os limites inferior e superior (-221.5;-88.9), revelando que os métodos são diferentes entre si e a diferença é a favor do método normalizado.

No trabalho de Kinzelman de 2003, foram analisadas amostras de águas doces para comparar o desempenho do teste Enterolert[®] em relação ao método normalizado de filtração por membrana. Até então a principal contestação em relação ao teste rápido era o facto de este não apresentar uma correlação significativa com o método normalizado, para além da dificuldade em isolar e confirmar os presuntivos positivos. No trabalho realizado em 1996 por Budnick, os resultados das análises de amostras de águas balneares para enumeração de enterococos, revelaram a equivalência entre a técnica da filtração por membrana e o teste Enterolert[®] para um limite de confiança de 95%.

4.6. Comparação dos resultados de enumeração utilizando diferentes meios de cultura selectivos e os testes enzimáticos

Os meios selectivos usados neste trabalho permitiram o crescimento das bactérias em estudo. No entanto, registou-se o crescimento de outras espécies, o que demonstra que para o tipo de águas analisadas os meios de cultura usados não são totalmente selectivos e específicos. Por selectividade, entende-se a capacidade que o meio de cultura possui para enumerar os microrganismos alvo presentes numa população onde os microrganismos não-alvo são abundantes. A selectividade é determinada pela razão entre o total de colónias típicas e o total de colónias enumeradas (típicas e atípicas). A especificidade descreve até que ponto as colónias de microrganismos não-alvo apresentam reacções características das colónias típicas. A especificidade é calculada através da razão entre o total de colónias típicas e atípicas confirmadas como positivas e o total de colónias enumeradas.

Segundo as normas, todas as colónias presuntivas positivas devem ser confirmadas. Quando este número é elevado, a confirmação de todas as colónias implica um aumento substancial da quantidade de trabalho e do custo da análise. Então

estabeleceu-se que um total de 10 por placa deve ser confirmado. Para todas as amostras analisadas foi confirmado um número mínimo de 10 colónias típicas e cinco colónias atípicas, segundo procedimento descrito nas respectivas normas. No entanto, em muitas amostras o número de bactérias não alvo presentes nas membranas foi muito elevado, tornando difícil seguir os critérios estabelecidos nas normas para contabilizar e confirmar as colónias típicas. As contagens só são possíveis de realizar adequadamente, quando no meio de cultura o número de colónias alvo e não alvo é reduzido. E em muitas das amostras analisadas o número de colónias encontram-se acima do limite de contagem, 100 colónias (Lightfoot & Maier, 2003).

Foram feitas também identificações da espécie através de galerias API. Na Tabela 4.VI, estão resumidas as contagens totais de bactérias, assim como, os totais de colónias típicas e atípicas confirmadas e não confirmadas, e ainda o cálculo da selectividade e da especificidade para cada meio de cultura selectivo usado neste estudo.

4.6.1. Coliformes Totais

O meio de cultura AGAR mENDO LES é selectivo para Coliformes Totais e foi usado através da técnica de filtração por membrana para comparação com o meio MLSA, meio de cultura lactosado aconselhado na Recomendação do IRAR nº05/2005 para pesquisa de bactérias coliformes e *Escherichia coli*. Pelos resultados representados na Tabela 4.VI, podemos constatar que o meio de cultura em estudo, AGAR mENDO LES, para além de enumerar um total de colónias superior, apresenta uma taxa de selectividade e especificidade superiores em relação ao meio MLSA. Os resultados da análise de variância a um factor indicam que os meios de cultura são estatisticamente diferentes para um grau de significância de 5%. Num estudo de Hörman e colaboradores publicado em 2006, os autores concluíram que estes meios são estatística-

Tabela 4.VI – Comparação dos diferentes meios de cultura selectivos.

Bactérias	Meio	n	Total colónias	Colónias típicas			Colónias atípicas			Selectividade (%)	Especificidade (%)
				Total	+	–	Total	+	–		
Coliformes Totais	MLSA	40	5488	1051	421	630	4437	1848	2589	19.1	41.3
	AGAR mENDOLLES	40	6791	1878	1878	0	4913	0	4913	27.7	100
<i>Escherichia coli</i>	MLSA	40	5488	1051	284	767	4437	0	4437	19.1	5.2
	AGAR mFC	40	4810	2012	671	1341	2798	0	2798	41.8	13.9
Enterococos	S&B	44	6834	4126	1650	2476	2708	677	2031	60.4	34.1
	BEAA	31	8840	8840	7072	1768	0	0	0	100.0	80.0

(+) Colónias confirmadas como positivas;

(-) Colónias não confirmadas.

mente equivalentes para um nível de significância de 99%, apesar de o meio de cultura AGAR mENDO LES apresentar uma média de enumeração de coliformes totais superior ao MLSA.

Comparando os resultados obtidos para o meio de cultura AGAR mENDO LES com os do teste Colilert[®], estes não foram estatisticamente equivalentes para um nível de significância de 5% através da comparação de médias num teste de amostras emparelhadas. No entanto, no trabalho realizado em 2003 os autores Chao e colaboradores, obtiveram enumerações equivalentes entre o teste Colilert[®] e o meio de cultura AGAR mENDO LES para cerca de 60% das amostras de água para consumo analisadas e enumerações superiores para o teste rápido em cerca de 40% das amostras.

4.6.2. Coliformes Fecais

O meio de cultura AGAR mFC, selectivo para coliformes fecais foi usado na técnica de filtração por membrana para comparação com o meio MLSA na enumeração de *E. coli*. Dos resultados representados na Tabela 4.VI, o meio de cultura AGAR mFC enumerou um número total de colónias inferior ao meio MLSA, mas o total de colónias típicas confirmadas foi bastante superior ao obtido pelo meio de cultura recomendado pelo IRAR. Esta diferença reflecte-se quando comparamos os meios no que diz respeito ao cálculo da selectividade e especificidade. O meio AGAR mFC apresenta uma taxa de selectividade superior à do meio MLSA, assim como a taxa de especificidade. A análise de variância a um factor realizada para testar a equivalência dos resultados obtidos na enumeração de Coliformes Fecais entre os dois meios de cultura, revelou existir uma diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%.

A comparação dos resultados da enumeração de *E. coli* em meio de cultura AGAR mFC com os do teste Colilert[®] revelou a existência de equivalência entre os dois

métodos, uma vez que, o teste estatístico *t* de *Student* para amostras emparelhadas não rejeitou a hipótese nula. Em 2003, os autores Chao e colaboradores demonstraram que o meio de cultura AGAR mFC não seria recomendado para enumeração de Coliformes Fecais em águas subtropicais, uma vez que, outros coliformes termotolerantes poderiam crescer neste meio de cultura interferindo com a enumeração de CF. No entanto, essa situação não pareceu acontecer na quantificação de *E. coli* através do teste Colilert[®].

4.6.3. Enterococos

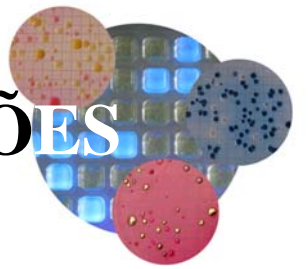
O meio de cultura S&B é o recomendado no método normalizado para enumeração de enterococos intestinais. No estudo de Dinísio e Borrego em 1995, demonstrou-se que este meio de cultura é bastante específico para a enumeração destes microrganismos em águas naturais. Audicana e seus colaboradores em 1995 demonstraram que o meio de cultura KAEE, usado normalmente para as confirmações, apresentava uma taxa de especificidade e recuperação superior aos meios de cultura S&B e KF. O meio de cultura BEAA é o meio de confirmação recomendado pela norma ISO 7899-2:2000 para enumeração de Enterococos Intestinais em águas. Este meio de cultura foi usado através da técnica da filtração por membrana como meio de cultura presuntivo para testar a possibilidade de reduzir as (44±4)h de incubação necessárias na utilização do meio S&B indicado no método normalizado a 24h. Dos resultados presentes na Tabela 4.VI, o meio de cultura confirmativo BEAA enumerou um número total de colónias superior ao total enumerado com o meio S&B, e todas com morfologia típica. Este resultado levou à conclusão de que este meio é 100% selectivo e bastante específico (taxa de especificidade de 80%). A comparação dos resultados da enumeração com os dois meios de cultura, através da análise de variância a um factor indicou que não existe homogeneidade de variâncias para um nível de significância 5%.

Ao analisar os resultados obtidos para o meio de cultura BEAA em comparação com os obtidos para o teste enzimático Enterolert[®], através do teste *t* de *Student* para amostras emparelhadas, a hipótese das médias serem equivalentes para um nível de significância de 5% foi também rejeitada. O que significa que poderá não existir uma equivalência entre os dois métodos.

4.7. Tecnologia IDEXX em uso nos laboratórios

O método Colilert[®] está referido no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (9223 B) como método para enumeração de *E. coli* com aplicação a amostras de águas de superfície. O limite de detecção para este método é de 1 Número Mais Provável por 100mL de amostra e a precisão de $\pm 20\%$ RPD (*Relative Percentage of Deviation*). Ainda não estão descritos procedimentos de calibração ou normalização, nem estão publicados dados de avaliação do desempenho deste método (Standard Operating Procedure for: *Escherichia coli* and Total Coliform using the IDEXX Quanti-Tray/2000, 2006). O teste enzimático Colilert[®] está aprovado ou aceite para análises de águas para consumo humano em 24 países, de entre os quais estão os quatro membros da União Europeia: Alemanha, Hungria, República Checa e Itália; e dois países não membros da UE: Islândia e Noruega. Na Dinamarca este método é usado como teste suplementar em alguns laboratórios de análise microbiológicas quantitativas, e parece ser bastante conhecido e robusto, embora seja reconhecida a necessidade de validação (Jeppesen, 2007). Nos Estados Unidos da América (EUA) a Agência para a Protecção do Ambiente (EPA) nomeou e aprovou os métodos Colilert[®] e Enterolert[®], para a enumeração de *E. coli* e enterococos e águas naturais (U.S. Environmental Protection Agency, 2003).

5. CONCLUSÕES



5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a tecnologia do substrato definido é mais sensível que o método normalizado de filtração por membrana para a enumeração de bactérias coliformes, *E. coli* e enterococos. À semelhança de outros trabalhos já realizados, apenas um número representativo de presumíveis positivos de cada amostra foi confirmado. Este procedimento pode tornar-se limitado, uma vez que, a selecção de um determinado número de colónias, poderá conduzir a resultados falsos. Assim, chega-se à conclusão que todas as colónias e poços positivos presuntivos devem ser confirmados. Este será o melhor procedimento para fornecer informação com maior segurança. No entanto, há que considerar que ao confirmar todos os positivos retiramos ao teste rápido uma das suas vantagens, a não necessidade de confirmação de poços positivos.

Foram já realizados vários estudos de comparação entre os métodos normalizados de filtração por membrana e os testes enzimáticos da tecnologia IDEXX, com a finalidade de estudar a equivalência entre os dois métodos para enumeração de bactérias coliformes e enterococos. Ainda não foi possível estabelecer uma correlação entre estes métodos. No entanto, os resultados obtidos até agora pelos diversos autores justificam a necessidade de prosseguir com mais trabalhos de investigação que visem a avaliação da precisão e exactidão dos métodos rápidos. O ideal será realizar-se um estudo a nível inter-laboratorial à semelhança do que foi já feito noutros países da Europa. A redução do número de amostras, mas a análise de diversos tipos de águas e com mais réplicas poderá ser uma estratégia que permite estabelecer a precisão dos métodos.

Apesar de ainda não se ter formalizado os testes enzimáticos como métodos de referência a nível da Europa, existem diversos laboratórios que estão a executar estes

métodos como testes suplementares nas suas análises de rotina. Mas é de grande importância que se estabeleça a equivalência entre os métodos de referência e os testes rápidos no que respeita à enumeração de bactérias coliformes, *E. coli* e enterococos, e para os diferentes tipos de águas. Isto porque, amostras com resultados acima e abaixo dos valores legislados poderão ser inadequadamente interpretadas, consoante os métodos utilizados para a enumeração dos parâmetros microbiológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Lenore S. Clescerl, Arnold E. Greenberg, e Andrew D. Eaton (20ª Edição). American Public Health Association, Washington, EUA.
- ANDREADAKIS, A.D. (1997). Wastewater treatment and disposal for the preservation of bathing and coastal water quality in touristic areas. *Marine Chemistry*. **58**: 389-395.
- ARI HÖRMAN, B.C. & HÄNNINENA, M-L. (2006). Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Research*. **40**: 3249-3256.
- AUDICANA, A.; PERALES, I. & BORREGO, J.J. (1995). Modification of Kanamycin-Esculin-Azide Agar to Improve Selectivity in the Enumeration of Fecal Streptococci from Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(12): 4178-4183.
- BANCROFT, K.; NELSON, N.T. & CHILDERS, G.W. (1989). Comparison of the Presence-Absence and Membrane Filter Techniques for Coliform Detection in Small, Nonchlorinated Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(2): 507-510.
- BESTERFIEL, D.H. (1986). *Quality control*, Prentice-Hall, USA, 358p.
- BUCKALEW, D.W.; HARTMAN, L.J.; GRIMSLEY, G.A.; MARTIN, A.E. & REGISTER, K.M. (2006). A long-term study comparing membrane filtration with Colilert® defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. *Journal of Environmental Management*. **80**(3): 191-197.
- BUDNICK, G.E.; HOWARD, R.T. & MAYO, D.R. (1996). Evaluation of Enterolert for Enumeration of Enterococci in Recreational Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(10): 3881-3884.
- CABELLI, V. J. (1989). Swimming associated illness and recreational water quality criteria. *Water Sci. Technol.* **21**:13–21. Em BUDNICK, G.E.; HOWARD, R.T. & MAYO, D.R. (1996). Evaluation of Enterolert for Enumeration of Enterococci in Recreational Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(10): 3881-3884.
- CAVACO, I. (2004). Apontamentos da disciplina Sistemas de Qualidade. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve. 156p.
- CHAO, K.K.; CHAO, C.C. & CHAO, W.L. (2003). Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbio Immunol Infect.* **36**: 288-293.
- CHIHARA, R.J.; SULLIVAN, M.A.; LIKIRDOPULOS, C.A.; SIMMONS III, O.D.; BURCH, C.L. & SOBSEY, M.D. (2005). Comparison of methods for detection of fecal coliforms and *E.*

- coli* in agricultural and municipal wastewater systems. *Animal Waste Management Symposium*. pp 616-622.
- DE ROUBIN, M.R.; OSSWALD, M.L.; BALLY, D.; CAILAS, M. & JORET, J.C. (1997). Comparison of field and standardized techniques for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water. IDEXX literature.
- DIONISIO, L.P.C. & BORREGO, J.J. (1995). Evaluation of media for the enumeration of faecal streptococci from natural water samples. *Journal of Microbiological Methods*. **23**:183-203.
- DIRECTIVA 2006/7/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE.
- DIRECTIVA Nº 76/160/CEE DO CONSELHO de 8 de Dezembro de 1975 relativa à qualidade das águas balneares.
- EA/EURACHEM. (2002). EA – 4/10 Accreditation for Microbiological Laboratories. Rev02.
- ECKNER, K.F. (1998). Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci Used in Drinking and Bathing Water Quality Monitoring in Southern Sweden. *Appl Environ Microbiol*. **64**(8): 3079-3083.
- EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B. & KRIZ, N.J. (1990). Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Source Water by the Defined Substrate Technology. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(2): 366-369.
- EFSTRATIOU, M.A. (2001). Managing Coastal Bathing Water Quality: The Contribution of Microbiology and Epidemiology. *Marine Pollution Bulletin*. **37**(6): 425-432.
- FEY, R. & GOGUE, J-M. (1983). *Princípios da gestão da qualidade*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 587p.
- FIGUERAS, M.J.; BORREGO, J.J.; PIKE, E.B.; ROBERTSON, W. & ASHBOLT, N. (2000). Sanitary Inspection and Microbiological Water Quality. Em Jamie Bartram and Gareth Rees (Ed.). *Monitoring Bathing Waters - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes*. WHO.
- FIKSDAL, L.; POMMEPUY, M.; CAPRAIS, M-P. & MIDTUN, I. (1994). Monitoring of Fecal Pollution in Coastal Waters by Use of Rapid Enzymatic Techniques. *Appl Environ Microbiol*. **60** (5): 1581-1684.
- FRICKER, E.J.; ILLINGWORTH, K.S. & FRICKER, C.R. (1997). Use of two formulations of Colilert and QuatritrayTM for assessment of the bacteriological quality of water. *Wat. Res*. **31**(10): 2495-2499.

GRABOW, W. (1996). Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. *Water S.A.*, **22**:193-202. Em AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; FERREIRA, L.A. & BARROS, L.S.S. (2003). Drinking water in rural farms as a risk factor to human health. *Rev. Saúde Pública.* **37**(4): 510-514.

GUIA INTERPRETATIVO DA NORMA NP EN ISO/IEC 17025 OGC001 de 2006.

GULEC, M.; BAKIR, B.; OGUR, R. & TEKBAS, O.F. (2002). Determination of Enteric Bacteria at Microbiologically Risky Points by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Microbiology.* **40**(4): 327-330.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. (1994). 9th Edition. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp 175. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.

JEPPesen, V.F. (2007). Coliform bacteria and *E. coli* in drinking water. Comparison of EU reference method with alternative methods. Danish Ministry of the Environment. Environmental Protection Agency.

KINZELMAN, J.N.C.; JACKSON, E.; GRADUS, S. & BAGLEY, R. (2003). Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Appl Environ Microbiol.* **69**(1): 92-96.

KREADER, C.A. (1995). Design and Evaluation of *Bacteroides* DNA Probes for the Specific Detection of Human Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(4): 1171-1179.

LANDRE, J.P.B.; GAVRIEL, A.A. & LAMB, A.J. (1998). False-positive coliform reaction mediated by *Aeromonas* in the Colilert defined substrate technology system. *Letters in Applied Microbiology.* **26**: 352-354.

LIGHTFOOD, N.F. & MAIER, E.A. (2003). *Análise microbiológica de alimentos e água. Guia para a garantia da qualidade*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 284p.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & PARKER, J. (1997). *Brock Biology of microorganisms*. 8^a Edição, Simon & Schuter (Ed), Prentice-Hall, Inc., EUA.

NIEMELÄ, S.I.; LEE, J.V. & FRICKER, C.R. (2003). A comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure. *Journal of Applied Microbiology.* **95**: 1285-1292.

NIEMI, R.M.; HEIKKILÄ, M.P.; LAHTI, K.; KALSO, S. & NIEMELÄ, S.I. (2001). Comparison of methods for determining the numbers and species distribution of coliform bacteria in well water samples. *Journal of Applied Microbiology.* **90**:850-858.

NOBLE, R.T. & WEISBERG, S.B. (2005). A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. *Journal of Water and Health.* **3**(4): 381-392.

- NORMA ISO 17994:2004. Water quality – Criteria for establishing equivalence between microbiological methods.
- NORMA NF EN ISO 7899-2 Agosto 2000. Qualité de l'eau Reserche et dénombrement des entérocoques intestinaux. Partie 2: Méthode par filtration sur membrane.
- NORMA NF EN ISO 9308-1 Setembro 2000. Qualité de l'eau Reserche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Partie 1: Méthode par filtration sur membrane.
- NORMA NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005).
- OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. (1983). The most probable number technique. Em (2ª Edição). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington D.C., pp 99-111.
- PELCZAR, M.; CHAN, E. & KRIEG, N. (1993). *Microbiology, Concepts and Applications*, pp .MacGraw-Hill, New York.
- PRESCOTT, HARLEY & KLEIN (1996). Microorganisms and Environment. Em Elizabeth M. Sievers. *Microbiology*. (3ª Edição) Wm. C. Brown Publishers, USA, pp 850-851.
- RECOMENDAÇÃO DO IRAR nº05/2005. Método alternativo para análise de bactérias coliformes e *Escherichia coli*.
- RELACRE. Guia RELACRE 6 Acreditação de laboratórios de ensaios microbiológicos.
- RIBAS, F., TUSELL, E., VANDEVENNE, C.A. & NIEMELA, S.I. (2006). Estudio para comprobar la equivalencia entre tres métodos alternativos y el método de referencia agar lactasa TTC tergitol 7 (ISO 9308-1:2000) en el recuento de bacterias coliformes y *Escherichia coli* en agua. Relatório dirigido ao Ministério da Sanidade e Consumo em apoio ao uso de métodos alternativos no controlo microbiológico de águas para consumo humano, de acordo com a directiva 98/83/CE.
- RICE, E.W.; ALLEN, M.J.; BRENNER, D.J. & EDBERG, S.C. (1991). Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia coli* and its application for drinking-water analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 592-593.
- ROMPRE, A.; SERVAIS, P; BAUDART, J.; DE-ROUBIN, M-R. & LAURENT, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. **49**: 31-54.
- SCHETS, F.M.; NOBEL, P.J.; STRATING, S.; MOOIJMAN, K.A.; ENGELS, G.B. & BROUWER, A. (2002). EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. *Letters in Applied Microbiology*. **34**: 227-231.

SCHETS, F.M.; NOBEL, P.J.; STRATING, S.; MOOIJMAN, K.A.; ENGELS, G.B. & BOUWER, A. (2001). Comparison of methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples in the Netherlands. *RIVM report 289202 028*, March 2001. 64p.

SCOTT, T.M.; ROSE, J.B.; JENKINS, T.M.; FARRAH, S.R. & LUKASIK, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Appl Environ Microbiol.* **68**(12): 5796-5803.

SINTON, L.W.; DONNISON, A.M. & HASTIE, C.M. (1993). Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. I. Taxonomy and enumeration, *N.Z.J. Mar. Freshwater Res.* **27**: 101-115.

SOUZA, J.B. & DANIEL, L.A. (2005). Comparação entre hipoclorito de sódio ácido peracético na inactivação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. *Eng. sanit. ambient.* **10**(2): 111-117.

STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR: *Escherichia coli* and Total Coliform using the IDEXX Quanti-Tray/2000 System with Colilert reagent (2006) (4010R01 Ecoli IDEXX.doc). Missouri State University and Ozarks Environmental and Water Resources Institute (OEWRI).

TOZE, S.; CAHILL, M.; SLY, L.I. & FUERST, J.A. (1994). The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology.* **77**:139-147.

TOZE, S.; SLY, L.I.; MACRAE, I.C. & FUERST, J.A. (1990). Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count bacteria isolated from chlorinated drinking water. *Current Microbiology.* **21**:139-143.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2003). Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Analytical Methods for Biological Pollutants in Ambient Water; Final Rule. *U.S. Federal Register - 40 CFR Part 136*(68), No. 139.

WADE, T.J.; CALDERON, R.L.; SAMS, E.; BEACH, M.; BRENNER, K.P.; WILLIAMS, A.H. & DUFOUR, A.P. (2006). Rapidly Measured Indicators of Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. *Environmental Health Perspectives.* **114**(1): 24-28.

HÍPERLIGAÇÕES

<http://utilizadores.leirianet.pt/~labmicbio/estrapagua.htm> (7 Junho 2006).

http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&do_c=PTG_CLN_PRD_G_PRD_2 (23 Julho 2007).

<http://www.civil.ist.utl.pt/Seminarios/Viajante/MVambiente.pdf> (7 Junho 2006).

<http://www.idexx.com/water/> (7 Junho 2006).

<http://www.idexx.com/water/enterolert-e/> (7 Junho 2006).

<http://www.idexx.com/water/quantitray/> (7 Junho 2006).

7. ANEXOS

A decorative graphic consisting of several overlapping circles. The circles have various colors and patterns: a light blue circle with a grid pattern, a dark blue circle with a grid pattern, a red circle with a grid pattern, a pink circle with a grid pattern, and a light blue circle with a grid pattern. The circles are arranged in a cluster, with some overlapping others.

7. ANEXOS

Anexo I – Tabela do Número Mais Provável IDEXX Quanti-Tray®

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.3	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.1	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.6	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.4	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.3	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	43

INDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)

Small Wells Positive

# Large Wells Positive	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.2	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.3	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.6	216.2	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.8	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.2	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.3	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.8	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.1	452.0	467.3	483.3	499.6	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.3	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.6	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.2
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1986.3	2419.6	>2419.6

Anexo II – Resultados das enumerações e tratamentos estatísticos realizados para bactérias Coliformes Totais

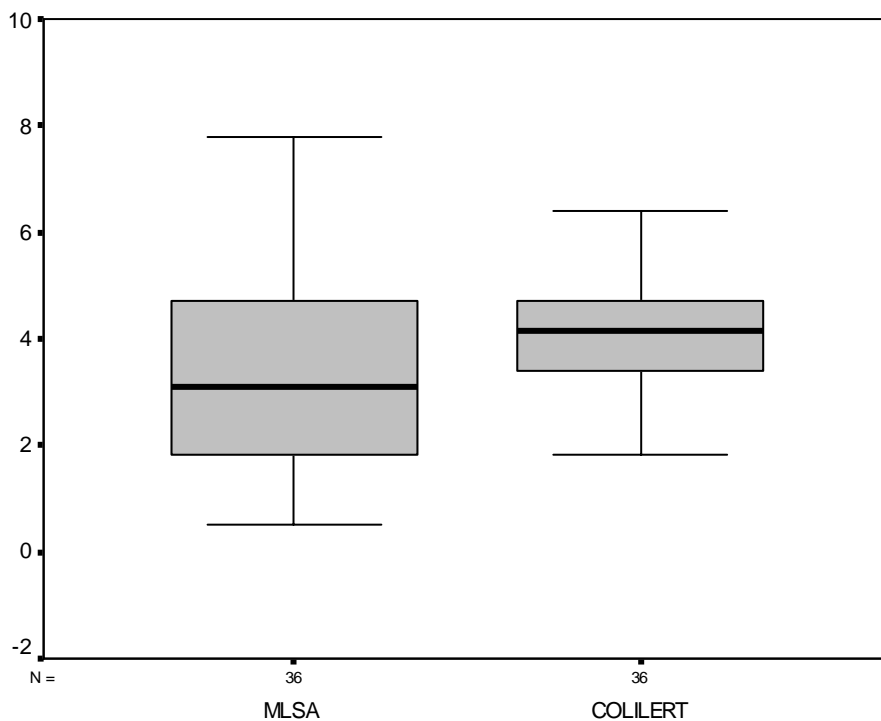
Enumeração de Coliformes Totais em MLSA, Colilert® e AGAR mENDO LES:

Coliformes Totais							
n	Amostra	MLSA	log MLSA	Colilert®	log Colilert®	AGAR mENDO LES	log AGAR mENDO LES
1	1	69,329	1,837447	4100	3,612784	1866,667	3,271067
2	2	639,96	2,767819	10900	4,037426	3666,667	3,564271
3	3	60,44067	1,77875	327	2,514548	1766,667	3,247155
4	4	6,220667	0,785587	4100	3,612784	3433,333	3,535716
5	5	3,335	0,497856	226	2,354108	2833,333	3,452298
6	6	3,779667	0,565896	1000	3	3933,333	3,594761
7	7	1795	3,249953	5794	3,762978	2933,333	3,467361
8	8	1600	3,179525	3590	3,555094	830	2,919078
9	9	166,6667	2,200687	1299,7	3,113843	433,3333	2,636822
10	10	61,33333	1,780952	6630	3,821514	330	2,518514
11	11	90,66667	1,950344	1100	3,041393	110	2,041393
12	12	156,6667	2,185434	1413,6	3,150327	113,3333	2,054358
13	13	93,33333	1,967334	1413,6	3,150327	190	2,278754
14	14	37,33333	1,571856	3130	3,495544	306,6667	2,486667
15	15	19	1,278352	3180	3,502427	183,3333	2,263241
16	16	80000	4,90309	241920	5,383672	80000	4,90309
17	17	90,66667	1,954869	48840	4,688776	80000	4,90309
18	18	48,66667	1,680683	198630	5,298045	1333,333	3,124939
19	19	4033,333	3,60416	40820	4,610873	56333,33	4,750765
20	20	20500	4,308093	44200	4,645422	56333,33	4,750765
21	21	1258,333	3,096562	52260	4,718169	63333,33	4,801632
22	22	1258,333	3,096562	10940	4,039017	8533,333	3,931119
23	23	80000	4,90309	92080	4,964165	80000	4,90309
24	24	12666,67	4,100146	20924	4,320645	54333,33	4,735066
25	25	80000	4,90309	242000	5,383815	80000	4,90309
26	26	80000	4,90309	484000	5,684845	80000	4,90309
27	27	80000	4,90309	484000	5,684845	80000	4,90309
28	28	7000	3,841828	24066	4,381404	34000	4,531479
29	29	80000	4,90309	34658	4,539803	59333,33	4,773299
30	30	43426,4	4,635391	24192	4,383672	53000	4,724276
31	31	1	0	1	0	1	0
32	32	80000	4,90309	24200	4,383815	50333,33	4,701856
33	33	114,2933	2,050476	2098	3,321805	1700	3,230449
34	34	21215,7	4,32487	17329	4,238774	33333,33	4,522879
35	35	27733,33	4,439522	51720	4,713659	43000	4,633468
36	36	1845	3,265867	0	0	3300	3,518514
37	37	60333333	7,77856	2419200	6,383672	61166667	7,786515
38	38	66666,67	4,799313	2419200	6,383672	500000	5,69897
39	39	50	1,69897	66,3	1,821514	360	2,556303
40	40	0	0	4,1	0,612784	10	1

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas MLSA vs Colilert®:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MLSA	36	100,0%	0	,0%	36	100,0%
COLILERT	36	100,0%	0	,0%	36	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	MLSA	3,1358	36	1,64466	,27411
	COLILERT	4,1385	36	1,08003	,18000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig,
Pair 1	MLSA & COLILERT	36	,785	,000

Paired Samples Test

	Paired Differences						t	df	Sig, (2-tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
				Lower	Upper				

Upper

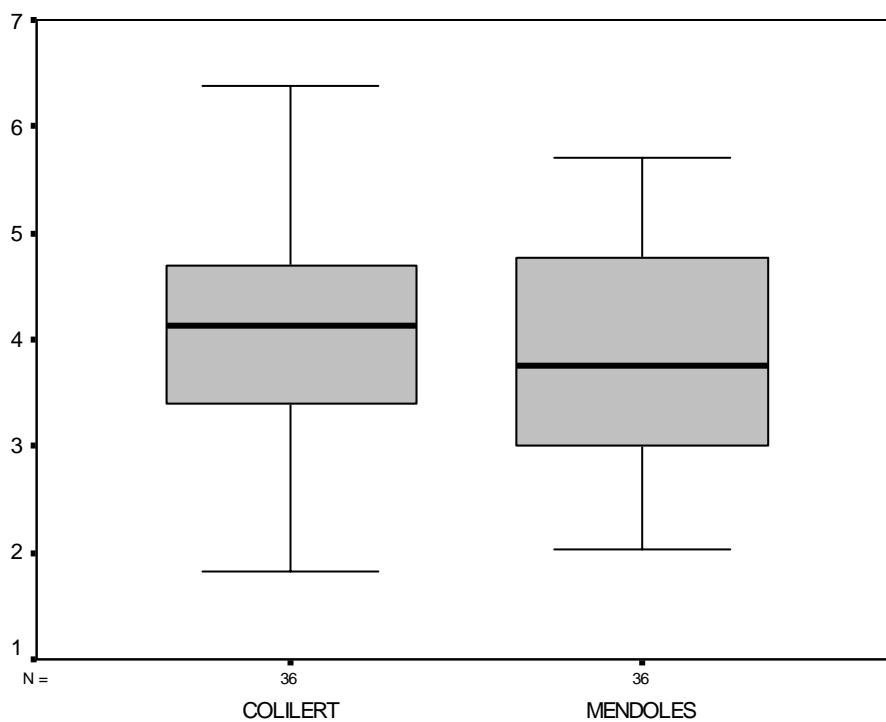
Pair 1

MLSA - COLILERT	-1,0027	1,03977	,17329	-	1,3545	-,6508	-5,786	35	,000
--------------------	---------	---------	--------	---	--------	--------	--------	----	------

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas Colilert® vs AGAR mENDO LES:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
COLILERT	36	100,0%	0	,0%	36	100,0%
AGAR mENDOLES	36	100,0%	0	,0%	36	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	COLILERT	4,0921	36	1,01473	,16912
	AGAR mENDOLES	3,8225	36	1,07034	,17839

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	COLILERT & AGAR mENDO LES	36	,782	,000

Paired Samples Test

	Paired Differences						t	df	Sig, (2- tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		Lower			
Upper									
Pair 1									
COLILERT - AGAR mENDO LES	,2696	,69052	,11509	,0360	,5032	2,342	35	,025	

Análise de variância a um factor para meios de cultura MLSA vs AGAR mENDO LES:

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MLSA	4,144	37	75	,000
AGAR mENDO LES	9,506	37	75	,000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MLSA	Between Groups	312,448	37	8,445	1018,795	,000
	Within Groups	,622	75	,008		
	Total	313,070	112			
AGAR mENDO LES	Between Groups	202,339	37	5,469	411,936	,000
	Within Groups	,996	75	,013		
	Total	203,335	112			

Teste de equivalência entre os métodos MLSA e Colilert® segundo a norma ISO 17994:2004:

Coliformes Totais						
n	Amostra	MLSA	ln MLSA	Colilert®	ln Colilert®	(lnColilert®-lnMLSA)×100
1	1	69,329	4,238863	4100	8,318742	407,9878964
2	2	639,96	6,461406	10900	9,296518	283,5112394
3	3	60,44066667	4,101662	327	5,78996	168,8298003
4	4	6,220666667	1,827877	4100	8,318742	649,0865171
5	5	3,335	1,204473	226	5,420535	421,606232
6	6	3,779666667	1,329636	1000	6,907755	557,8119457
7	7	1795	7,49276	5794	8,664578	117,1817877
8	8	1600	7,377759	3590	8,185907	80,81485733
9	9	166,6666667	5,115996	1299,7	7,169889	205,3892938
10	10	61,33333333	4,116323	6630	8,79936	468,3036614
11	11	90,66666667	4,50719	1100	7,003065	249,5875681
12	12	156,6666667	5,05412	1413,6	7,253895	219,9774515
13	13	93,33333333	4,536177	1413,6	7,253895	271,7717607
14	14	37,33333333	3,619887	3130	8,048788	442,8901701
15	15	19	2,944439	3180	8,064636	512,0197497
16	16	80000	11,28978	241920	12,39636	110,6580458
17	17	90,66666667	4,50719	48840	10,7963	628,9115151
18	18	48,66666667	3,884994	198630	12,1992	831,4204744
19	19	4033,333333	8,302348	40820	10,61693	231,4578993
20	20	20500	9,92818	44200	10,69648	76,82999029
21	21	1258,333333	7,137543	52260	10,86399	372,6443166
22	22	1258,333333	7,137543	10940	9,300181	216,2637703
23	23	80000	11,28978	92080	11,43041	14,06311297
24	24	12666,66667	9,446729	20924	9,948652	50,19229545
25	25	80000	11,28978	242000	12,39669	110,6911091
26	26	80000	11,28978	484000	13,08984	180,0058272
27	27	80000	11,28978	484000	13,08984	180,0058272
28	28	7000	8,853665	24066	10,08856	123,4889907
29	29	80000	11,28978	34658	10,45328	-83,64980555
30	30	43426,4	10,67882	24192	10,09378	-58,50455511
31	32	80000	11,28978	24200	10,09411	-119,5674002
32	33	114,2933333	4,738768	2098	7,64874	290,9971546
33	34	21215,7	9,962497	17329	9,760137	-20,2360075
34	35	27733,33333	10,23039	51720	10,8536	62,32094947
35	36	1845	7,520235	0	---	-752,0776415
36	37	6033333,33	17,9154	2419200	14,69895	-321,6447836
37	38	66666,66667	11,10746	2419200	14,69895	359,1487108
38	39	50	3,912023	66,3	4,19419	28,21668918
39	40	0	---	4,1	-1,41099	162,924054
					Média	198,2392428
					Desvio-Padrão	278,8972235
					Incerteza expandida	89,31859501
					Limite inferior	108,9206478
					Limite superior	287,5578378

(---) Não aplicável.

Anexo III – Resultados das enumerações e tratamentos estatísticos realizados para *Escherichia coli*

Enumeração de *Escherichia coli* em MLSA, Colilert® e AGAR mFC:

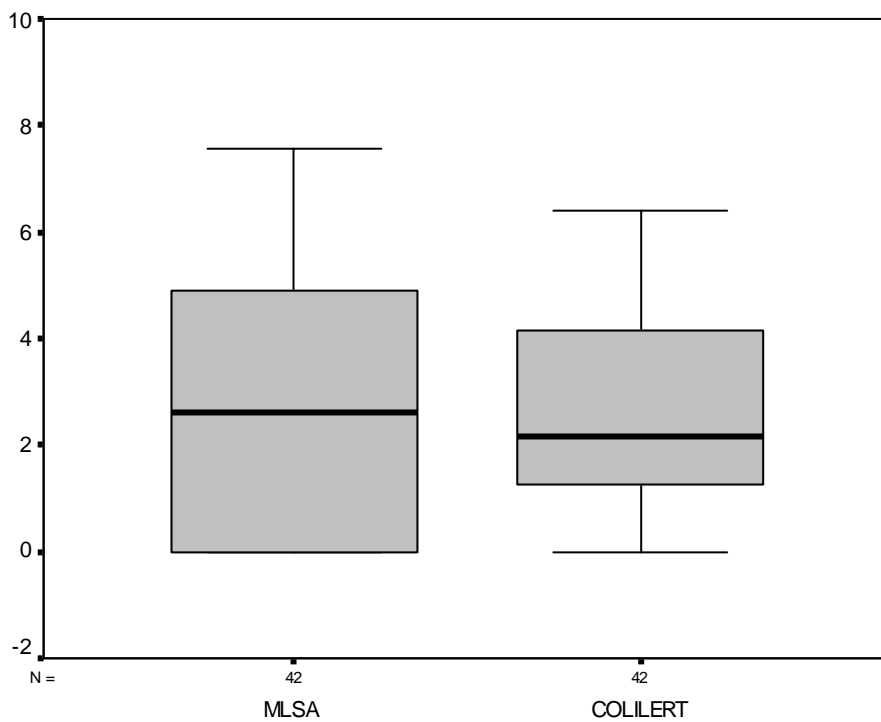
<i>Escherichia coli</i>							
n	Amostra	MLSA	log MLSA	Colilert®	log Colilert®	AGAR mFC	log AGAR mFC
1	1	34,671	1,539966	1	0	110	2,041393
2	2	320,04	2,505204	3100	3,491362	2233,333	3,348954
3	3	30,226	1,480381	41	1,612784	63,33333	1,801632
4	4	1	0	30	1,477121	1000	3
5	5	3,335	0,523096	10	1	566,6667	2,753328
6	6	1	0	10	1	1433,333	3,156347
7	7	1	0	20	1,30103	196,6667	2,293731
8	8	533,3333	2,726999	235,9	2,372728	1233,333	3,09108
9	9	16,66667	1,221849	100	2	33,33333	1,522879
10	10	1	0	18,7	1,271842	630	2,799341
11	11	11,33333	1,054358	12	1,079181	30	1,477121
12	12	31,33333	1,496007	3,1	0,491362	233,3333	2,367977
13	13	1	0	11	1,041393	166,6667	2,221849
14	14	1	0	73,3	1,865104	166,6667	2,221849
15	15	1	0	32,7	1,514548	26,66667	1,425969
16	16	80000	4,90309	13960	4,144885	80000	4,90309
17	17	22,66667	1,355388	44,1	1,644439	46,66667	1,669007
18	18	1	0	214,2	2,330819	1333,333	3,124939
19	19	80000	4,90309	6265	3,796921	55333,33	4,742987
20	20	12300	4,089905	7090	3,850646	54000	4,732394
21	21	1258,333	3,099796	21093	4,324138	72000	4,857332
22	22	1258,333	3,099796	1596	3,203033	7233,333	3,859338
23	23	80000	4,90309	104	2,017033	1666,667	3,221849
24	24	80000	4,90309	60	1,778151	566,6667	2,753328
25	25	80000	4,90309	242000	5,383815	80000	4,90309
26	26	80000	4,90309	397260	5,599075	80000	4,90309
27	27	80000	4,90309	484000	5,684845	80000	4,90309
28	28	80000	4,90309	2162	3,334856	31000	4,491362
29	29	80000	4,90309	5226	3,718169	51666,67	4,71321
30	30	27139,6	4,433603	19863	4,298045	80000	4,90309
31	31	1	0	1	0	1	0
32	32	80000	4,90309	24200	4,383815	80000	4,90309
33	33	1	0	30	1,477121	1900	3,278754
34	34	7071,9	3,849536	5172	3,713659	19000	4,278754
35	35	10400	4,017033	6440	3,808886	5333,333	3,726999
36	36	1845	3,265996	1	0	166,6667	2,221849
37	37	36200000	7,558709	2419200	6,383672	8566667	6,932812
38	38	1	0	248100	5,394627	1	0
39	39	1	0	1	0	30	1,477121
40	40	1	0	1	0	1	0
41	41	34000	4,531479	52000	4,716003	230000	5,361728
42	42	33000	4,518514	40400	4,606381	*	---

(*) Amostra não analisada neste meio de cultura; (---) Não aplicável.

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas MLSA vs Colilert®:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MLSA	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%
COLILERT	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	MLSA	2,5095	42	2,18891	,33776
	COLILERT	2,6217	42	1,85004	,28547

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	MLSA & COLILERT	42	,734	,000

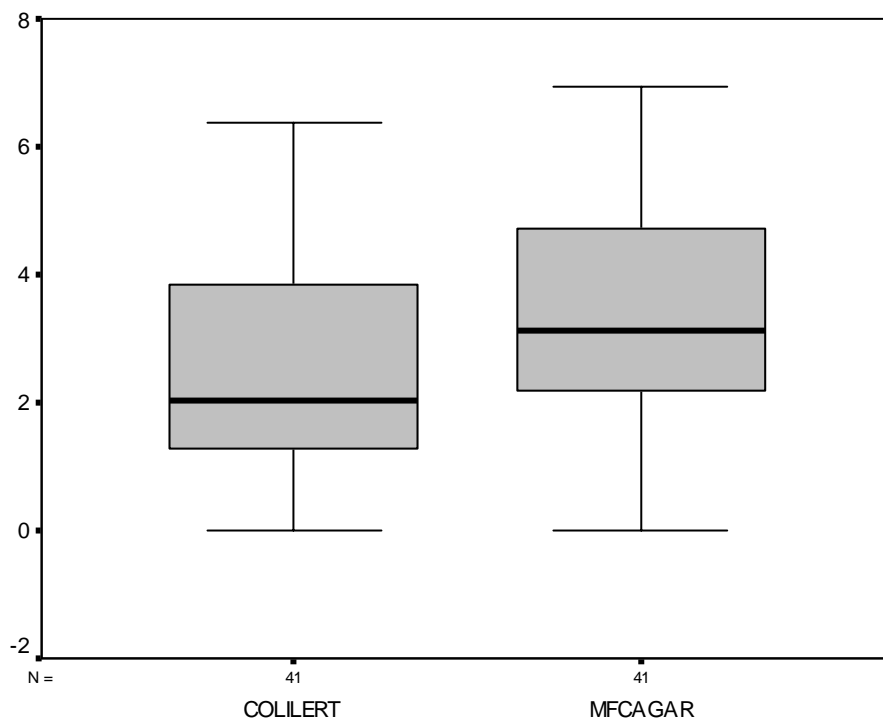
Paired Samples Test

	Paired Differences						<i>t</i>	df	Sig, (2-tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
				Lower	Upper				
Upper									
Pair 1									
MLSA - COLILERT	-,1122	1,50640	,23244	-,5816	,3572	-,483	41	,632	

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas Colilert® vs AGAR mFC:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
COLILERT	41	100,0%	0	,0%	41	100,0%
AGAR mFC	41	100,0%	0	,0%	41	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	COLILERT	2,5977	41	1,81743	,28383
	AGAR mFC	3,1789	41	1,60234	,25024

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	COLILERT & AGAR mFC	41	,749	,000

Paired Samples Test

	Paired Differences						t	df	Sig, (2-tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
Upper				Lower					
Pair 1									
COLILERT - AGAR mFC	-,5812	1,22753	,19171	-,9687	-,1938	-3,032	40	,004	

Teste para equivalência entre os métodos MLSA e Colilert® segundo a norma ISO 17994:2004:

<i>Escherichia coli</i>						
n	Amostra	MLSA	ln MLSA	Colilert®	ln Colilert®	(ln Colilert®-lnMLSA)×100
1	1	34,671	3,545903603	1	0	-357,4338034
2	2	320,04	5,768445988	3100	8,03915739	227,0711402
3	3	30,226	3,408702481	41	3,713572067	30,48695856
4	4	1	0	30	3,401197382	440,1197382
5	5	3,335	1,204472679	10	2,302585093	109,8112414
6	6	1	0	10	2,302585093	239,7895273
7	7	1	0	20	2,995732274	304,4522438
8	8	533,3333333	6,27914662	235,9	5,463407986	-81,57386331
9	9	16,66666667	2,813410717	100	4,605170186	179,1759469
10	10	1	0	18,7	2,928523524	298,0618636
11	11	11,33333333	2,427748236	12	2,48490665	5,715841384
12	12	31,33333333	3,444682494	3,1	1,131402111	-231,3280382
13	13	1	0	11	2,397895273	248,490665
14	14	1	0	73,3	4,294560609	430,8110952
15	15	1	0	32,7	3,487375078	351,7497837
16	16	80000	11,28978191	13960	9,543951376	-174,5830537
17	17	22,66666667	3,120895417	44,1	3,786459782	66,55643659
18	18	1	0	214,2	5,366910158	537,1567828
19	19	80000	11,28978191	6265	8,742733867	-254,7048046
20	20	12300	9,417354541	7090	8,86644062	-55,09139218
21	21	1258,333333	7,137543373	21093	9,956696511	281,9153138
22	22	1258,333333	7,137543373	1596	7,375255778	23,7712405
23	23	80000	11,28978191	104	4,644390899	-664,5391015
24	24	80000	11,28978191	60	4,094344562	-719,5437351
25	25	80000	11,28978191	242000	12,39669301	110,6911091
26	26	80000	11,28978191	397260	12,89234626	160,2564343
27	27	80000	11,28978191	484000	13,08984019	180,0058272
28	28	80000	11,28978191	2162	7,678788998	-361,0992915
29	29	80000	11,28978191	5226	8,561401446	-272,8380468
30	30	27139,6	10,20874919	19863	9,896613984	-31,21352113
31	32	80000	11,28978191	24200	10,09410791	-119,5674002
32	33	1	0	30	3,401197382	343,3987204
33	34	7071,9	8,863884464	5172	8,55101474	-31,28697241
34	35	10400	9,249561085	6440	8,770283819	-47,9277266
35	36	1845	7,520234556	1	0	-752,0776415
36	37	36200000	17,40456968	2419200	14,69894746	-270,5622212
37	38	1	0	248100	12,42158717	1242,15912
38	41	34000	10,4341158	52000	10,858999	42,4883194
39	42	33000	10,40426284	40400	10,60658506	20,23222235
					Média	37,15376817
					Desvio-Padrão	364,9432877
					Incerteza expandida	116,8753898
					Limite inferior	-79,72162163
					Limite superior	154,029158

Nota: Foram eliminadas do tratamento as amostras 31, 39 e 40 por apresentarem para ambos os métodos enumerações iguais a zero.

Anexo IV – Resultados das enumerações e tratamentos estatísticos realizados para enterococos

Enumeração de enterococos em S&B, Enterolert[®] e BEAA:

Enterococos							
n	Amostra	S&B	log S&B	Enterolert [®]	log Enterolert [®]	BEAA	log BEAA
1	1	520	2,714303	1374	3,1379867	*	---
2	2	51	1,70757	4360	3,6394865	*	---
3	3	36	1,548971	10	1	*	---
4	4	34	1,530977	1	0	*	---
5	5	300	2,474525	5172	3,7136585	*	---
6	6	124,6667	2,093242	41	1,6127839	*	---
7	7	24,66667	1,380211	41	1,6127839	*	---
8	8	192,6667	2,28455	1	0	*	---
9	9	0	1	10	1	*	---
10	10	39,33333	1,592577	52	1,7160033	*	---
11	11	57,66667	1,756964	30	1,4771213	*	---
12	12	72,66667	1,857221	41	1,6127839	*	---
13	13	500	2,660757	278	2,4440448	296,6667	2,46414
14	14	766,6667	2,867353	341	2,5327544	516,6667	2,71319
15	15	900	2,92605	402	2,6042261	420	2,61705
16	16	1066,667	3,011141	457	2,6599162	913,3333	2,96005
17	17	833,3333	2,916063	537	2,7299743		2,60742
18	18	350	2,5	85	1,9294189	86,66667	1,92313
19	19	466,6667	2,492374	110	2,0413927	156,6667	2,18735
20	20	600	2,751758	134	2,1271048	206,6667	2,31447
21	21	266,6667	2,359727	30	1,4771213	70	1,82571
22	22	270	2,423171	733	2,865104	56,66667	1,73471
23	23	100	2	1	0	1	0
24	24	140	2,116749	1	0	10,33333	0,76701
25	25	866,6667	2,937192	1	0	30	1,43368
26	26	2000	3,30103	1	0	33,33333	1,49237
27	27	20	1,259384	1	0	17	0,92605
28	28	5033,333	3,693317	909	2,9585639	22666,67	4,34938
29	29	1666,667	3,214813	278	2,4440448	3533,333	3,5407
30	30	8333,333	3,920141	1100	3,0413927	15333,33	4,17178
31	31	2533,333	3,401717	705	2,8481891	6666,667	3,82309
32	32	3700	3,558373	359	2,5550944	4766,667	3,67819
33	33	2333,333	3,361525	638	2,8048207	4666,667	3,66847
34	34	2266,667	3,355293	573	2,7581546	4133,333	3,6155
35	35	4300	3,633155	2282	3,3583156	7400	3,86789
36	36	11333,33	4,025182	5794	3,7629785	23666,67	4,36935
37	37	3866,667	3,577459	1414	3,1504494	7066,667	3,84525
38	38	3200	3,504716	1071	3,0297895	5566,667	3,74259
39	39	1966,667	3,29031	529	2,7234557	4400	3,64292
40	40	3066,667	3,486303	2382	3,3769418	2666,667	3,42549
41	41	60	1,650515	1	0	33,33333	1,51877
42	42	166,6667	2,157585	1	0	1	0
43	43	1,154263	0	1	0	4	0,33333
44	44	120	2,075962	1	0	1	0
45	45	1966,667	3,286979	1460	3,1643529	1866,667	3,26436

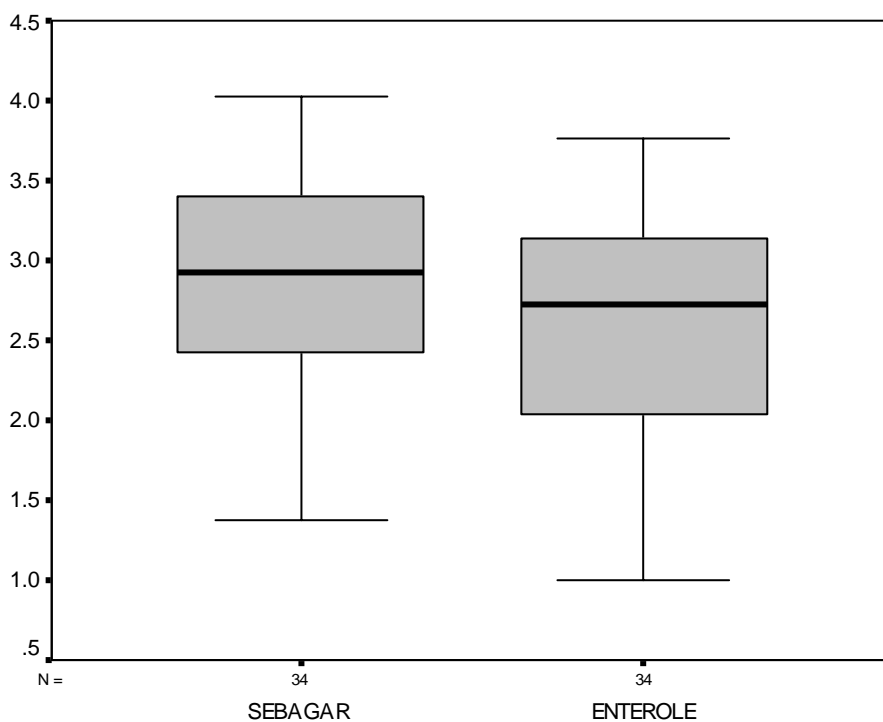
46	46	2333,333	3,356433	2146,67	3,3317646	*	---
----	----	----------	----------	---------	-----------	---	-----

(*) Amostra não analisada neste meio de cultura; (---) Não aplicável.

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas S&B vs Enterolert®:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
SEBAGAR	34	100,0%	0	,0%	34	100,0%
ENTEROLERT	34	100,0%	0	,0%	34	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	SEB	2,8441	34	,73293	,12570
	ENTEROLERT	2,5950	34	,71464	,12256

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	SEB & ENTEROLERT	34	,677	,000

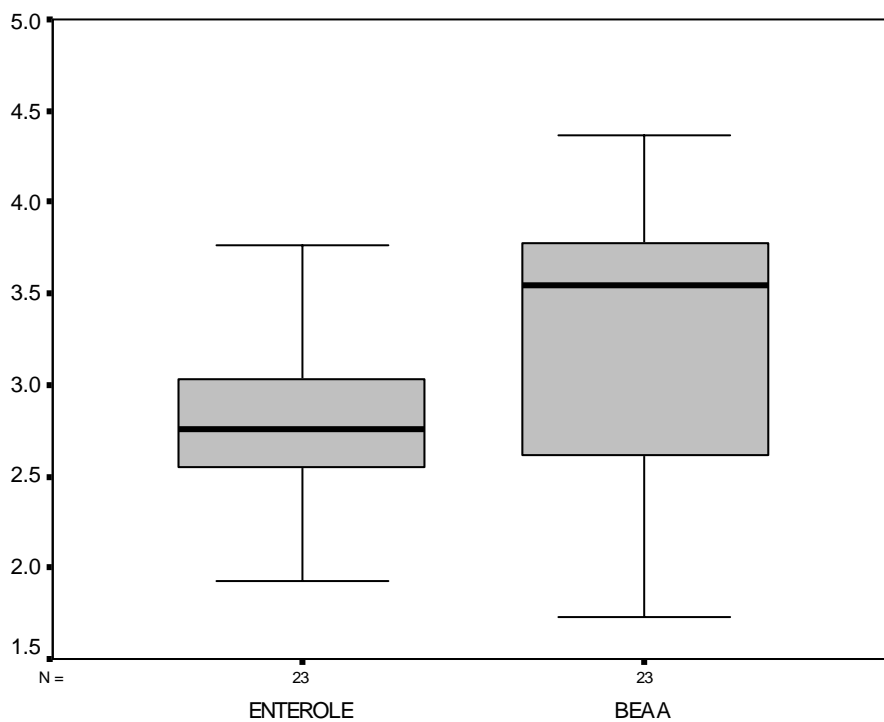
Paired Samples Test

	Paired Differences					95% Confidence Interval of the Difference	t	df	Sig, (2- tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	Lower	Upper				
Pair 1									
SEB - ENTEROLERT	,2491	,58216	,09984	,0460	,4522	2,495	33	,018	

Teste *t* de Student para amostras emparelhadas Enterolert® vs BEAA:

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ENTEROLERT	23	100,0%	0	,0%	23	100,0%
BEAA	23	100,0%	0	,0%	23	100,0%



t-Test

Paired Samples Statistics

Pair		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	ENTEROLERT	2,7783	23	,43703	,09113
	BEAA	3,2400	23	,77687	,16199

Paired Samples Correlations

Pair		N	Correlation	Sig.
Pair 1	ENTEROLERT &	23	,689	,000

BEAA			
------	--	--	--

Paired Samples Test

	Paired Differences						<i>t</i>	df	Sig, (2-tailed)
	Mean	Std, Deviation	Std, Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
				Lower	Upper				
Pair 1									
ENTEROLERT - BEAA	-,4617	,57146	,11916	-,7089	-,2146	-3,875	22	,001	

Análise de variância a um factor para os meios de cultura S&B vs BEAA:

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
SEB	3,927	43	85	,000
BEAA	8,455	31	62	,000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SEB	Between Groups	73,520	43	1,710	68,977	,000
	Within Groups	2,107	85	,025		
BEAA	Total	75,627	128		10,533	,000
	Between Groups	137,721	32	4,304		
	Within Groups	25,333	62	,409		
	Total	163,055	94			

Teste de equivalência entre os métodos S&B e Enterolert® segundo norma ISO 17994:2004:

Enterococos						
n	Amostra	S&B	ln S&B	Enterolert®	ln NMP Enterolert®	(lnEnterolert® -lnS&B)×100
1	1	520	6,253828812	1374	7,225481473	97,16526612
2	2	51	3,931825633	4360	8,380227336	444,8401704
3	3	36	3,583518938	10	2,302585093	-128,0933845
4	4	34	3,526360525	0	---	-355,5348061
5	5	300	5,703782475	5172	8,55101474	284,7232265
6	6	124,6666667	4,825643509	41	3,713572067	-111,2071442
7	7	24,66666667	3,205452805	41	3,713572067	50,81192622
8	8	192,6666667	5,26096158	0	---	-526,6138468
9	9	10	2,302585093	10	2,302585093	0
10	10	39,33333333	3,672072336	52	3,951243719	27,91713828
11	11	57,66666667	4,054679306	30	3,401197382	-65,34819242
12	12	72,66666667	4,285882774	41	3,713572067	-57,23107074
13	13	500	6,214608098	278	5,627621114	-58,69869847
14	14	766,6666667	6,642052113	341	5,831882477	-81,0169636
15	15	900	6,802394763	402	5,996452089	-80,59426747
16	16	1066,666667	6,9722938	457	6,124683391	-84,76104092
17	17	833,3333333	6,725433722	537	6,285998095	-43,94356277
18	18	350	5,857933154	85	4,442651256	-141,5281898
19	19	466,6666667	6,145615227	110	4,700480366	-144,5134861
20	20	600	6,396929655	134	4,8978398	-149,9089855
21	21	266,6666667	5,585999439	30	3,401197382	-218,4802057
22	22	270	5,598421959	733	6,597145702	99,87237429
23	23	100	4,605170186	0	---	-461,5120517
24	24	140	4,941642423	0	---	-494,875989
25	25	866,6666667	6,764654435	0	---	-676,5807616
26	26	2000	7,60090246	0	---	-760,1402335
27	27	20	2,995732274	0	---	-304,4522438
28	28	5033,333333	8,523837734	909	6,812345094	-171,149264
29	29	1666,666667	7,418580903	278	5,627621114	-179,0959789
30	30	8333,333333	9,028018815	1100	7,003065459	-202,4953356
31	31	2533,333333	7,837291238	705	6,558197803	-127,9093435
32	32	3700	8,216088099	359	5,883322388	-233,276571
33	33	2333,333333	7,755053139	638	6,458338283	-129,6714856
34	34	2266,666667	7,726065602	573	6,350885717	-137,5179886
35	35	4300	8,366370302	2282	7,73280753	-63,35627713
36	36	11333,33333	9,335503515	5794	8,664578178	-67,09253366
37	37	3866,666667	8,260148088	1414	7,254177846	-100,5970242
38	38	3200	8,070906089	1071	6,97634807	-109,4558018
39	39	1966,666667	7,584095341	529	6,270988432	-131,3106909
40	40	3066,666667	8,028346474	2382	7,77569575	-25,26507245
41	41	60	4,094344562	0	---	-411,0873864
42	42	166,6666667	5,11599581	0	---	-512,1977881
43	43	1,154263332	0,143462332	0	---	-76,74488237
44	44	120	4,787491743	0	---	-479,5790546
45	45	1966,666667	7,584095341	1460	7,286191715	-29,79036265
46	46	2333,333333	7,755053139	2146,666667	7,67167153	-8,338160894

					Média	-155,1225223
					Desvio-Padrão	225,2571146
					Incerteza expandida	66,42469923
					Limite inferior	-221,5472215
					Limite superior	-88,69782307

(---) Não aplicável.