

# AGENTES BACTERIOLÓGICOS E MÉTODOS

Filipa Ferreira  
Raquel Rodrigues  
DSA, UAS, ASMI-L

INSA, 16 de Setembro de 2011

# SUMÁRIO

- Historial
- Laboratório
  - Pesquisa de coliformes totais e *E. coli* por NMP
  - Pesquisa de enterococos por NMP
  - Vantagens do método NMP
  - Desvantagens do método NMP
  - Controlo de Qualidade
  - Expressão dos resultados

# HISTORIAL

- 2001 – Campanha «Areia Limpa, Praia Saudável»
- No âmbito do projecto “ICREW” ambas as entidades (INSA e APA) procederam à revisão, validação e desenvolvimento de alguns conceitos.

# HISTORIAL (cont.)

- Conclusões:
  - Monitorização da qualidade das areias das praias - **análise da areia seca.**
    - A água fornece informação que pode dispensar a análise da areia molhada ( correlação positiva entre estes dois parâmetros);
  - Os indicadores com melhor desempenho foram os **coliformes totais**, a ***Escherichia coli*** e os **enterococos intestinais.**

# HISTORIAL (cont.)

- **Conclusões (cont)**

- o método selecionado foi o Número Mais Provável (NMP) para a determinação de coliformes totais incluindo *E. coli* (HPA NHS W18:2005);
- o método do NMP para os enterococos intestinais (ASTM D 6503-99:2005).

# HISTORIAL (cont.)

- Valores Máximos Recomendados (**VMR**) e Valores Máximos Admissíveis (**VMA**)

Parâmetros	VMR	VMA
<b>Coliformes totais</b>	5 pfc/g	100 pfc/g
<b><i>Escherichia coli</i></b>	1 pfc/g	20 pfc/g
<b>Enterococos intestinais</b>	1 pfc/g	20pfc/g

Tabela 1

Os valores indicados basearam-se nos valores limites aceites para a classificação das águas balneares indicados na legislação em vigor , àquela data.

# LABORATÓRIO



# Pesquisa de coliformes totais e *E.coli* por NMP

- Num copo com anti-espuma adiciona-se 10 ml de amostra (lavado da areia) e 90 ml de água destilada estéril;
- Acrescenta-se o meio de cultura Colilert-18 e aguarda-se 10 minutos até dissolver;
- Homogeniza-se bem e coloca-se num Quanty Tray, selando no aparelho.



# Pesquisa de coliformes totais e *E.coli* por NMP (cont.)

- Incuba-se ( $18 \pm 2$ ) horas a ( $36 \pm 2$ ) °C
- A utilização do substrato ONPG, pela enzima  $\beta$ -galactosidase (acidificação do meio e respectiva viragem do indicador);
- Total de poços amarelos = NMP de **coliformes totais**, presente em 10 ml de amostra (equivalente a 1 g de areia).



**IDEXX  
51-Well Quanti-Tray®  
MPN Table**

No. of wells giving positive reaction	MPN per 100 ml sample	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0	<1.0	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34	39.1	39.1	39.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	> 200.5	146.1	infinite

28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0

IDEXX Sales and Technical Support  
1-800-321-0207 or 1-207-856-0496  
[www.idexx.com/water](http://www.idexx.com/water)

**Table MPN IDEXX Quanti-Tray/2000**  
# Petits Puits Positifs

# Grands Puits Positifs	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	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	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	22.6	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	12.4	13.4	14.4	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	25.2	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	15.9	17.0	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	7.4	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	17.5	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	14.3	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	22.7	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	39.4	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	41.1	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	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	24.0	25.3	26.5	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	46.4	47.8	49.1	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	31.4	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	27.8	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	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	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	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.3	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	41.3	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	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	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	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	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	82.3
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	72.8	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	68.1	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	54.7	56.5	58.3	60.1	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	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	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	100.1	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	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3
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	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4
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	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	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	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	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	135.3	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.3	126.7	130.1	133.6	137.1	140.8	144.5	148.3	152.2	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	155.1	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	167.8	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	131.3	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	177.9	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	166.9	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	206.3	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	260.2	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	34				

# Pesquisa de coliformes totais e *E.coli* por NMP (cont.)

- Na câmara de UV (360 nm) contam-se os poços com fluorescência, que revelam a produção de  $\beta$ -Glucoronidase pelo organismo alvo;



- Aplicando a tabela calcular o NMP de *E. coli* presente em 10 ml de amostra.

# Pesquisa de enterococos por NMP

- Num copo com anti-espuma adiciona-se 10 ml de amostra (lavado) e 90 ml de água destilada estéril;
- Acrescenta-se o meio de cultura Enterolert-E e aguarda-se 10 minutos até dissolver;
- Homogeniza-se bem e coloca-se num Quantity Tray.

# Pesquisa de enterococos por NMP (cont.)

- Incuba-se ( $24 \pm 4$ ) horas, a ( $41 \pm 0,5$ ) °C e contam-se os poços fluorescentes em câmara de UV, que revelam a produção da enzima  $\beta$ -D-glucosidase;
- Total de poços fluorescentes = NMP de **enterococos**, presentes em 10 ml de amostra depois de comparado com a tabela.

# Vantagens do método NMP

- Operacionalmente muito superior.
- Não exige preparação de meios, esterilização destes ou de material.
- Resposta mais rápida ( $18\pm 2$ ) ou ( $24\pm 4$ ) horas
- Muito fácil leitura
- Muito menos subjectivo – pouca influência da perícia do operador.

# Desvantagens do método NMP

- Elevado custo do selador



# Controlo de Qualidade

- Controlo de Qualidade Interno
  - Por cada lote e de 3 em 3 meses
    - Colilert
      - C+ - Mistura de *Klebsiella aerogenes* e *E. coli*
      - C- - *Pseudomonas aeruginosa*
    - Enterolert
      - C+ - *Enterococcus faecium*
      - C- - *Serratia marcescens*  
*Aerococcus viridians*  
*Klebsiella oxytoca*

# Controlo de Qualidade (cont.)

- Controlo de Qualidade Externo
  - Participação em Ensaios Interlaboratoriais do Programa Internacional EQUASE.

# Expressão dos resultados

- Os resultados são expressos em pfc/g.
- As apreciações baseiam-se na Tabela 1, sendo as areias classificadas como:
  - “Os valores obtidos **não excedem** os valores recomendados”
  - “Os valores obtidos **excedem** os valores recomendados”



Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, LP

Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa P o r t u g a l http://www.insa.pt info@insa.min-saude.pt  
 telef. +351 217 519 200 fax. +351 217 526 400

Departamento Saúde Ambiental  
 Unidade Água e Solo

Laboratório Microbiologia



Instituto\_Nacional de Saúde  
 Doutor Ricardo Jorge

Telf. (+351) 217 526 446 Fax. (+351) 217 526 446

### Relatório de Ensaio - Análise bacteriológica de areia

#### Dados da colheita

Identificação:

Concelho:

Local:

Natureza da amostra: Areia

Origem:

Ponto de colheita: Zona seca

Data de colheita: 29/08/2011

Efectuada por:

Transportada por : Transportadora

Amostragem : DSA ASMI-PE01\_03 L (não incluída na acreditação)

Nº Requisição: \*\*\*\*\* Nº Amostra: \*\*\*\*\*

Data de entrada: 30/08/2011

Início dos ensaios: 30/08/2011

Fim dos ensaios: 02/09/2011

### Resultados

Parâmetro, Método	Resultados	Unidades	VMR**
Bactérias coliformes, DSA ASMI-PE13_02L (HPA NHS W18:2005) - NMP	<1	plc/g	100/g
<i>Escherichia coli</i> , DSA ASMI-PE13_02L (HPA NHS W18:2005) - NMP	<1	plc/g	20/g
Enterococos intestinais, ASTM D 6503-99:2005-NPM	1	plc/g	20/g
NMP - Número mais provável      ufc - Unidades formadoras de colónias      VMR - Valor máximo recomendado			

### Apreciação de resultados

OS VALORES OBTIDOS NÃO EXCEDEM OS VALORES RECOMENDADOS.

Data de saída : 02/09/2011

*Natália Faria*

Natália Faria  
 Responsável Técnico

