



## **ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA**

### **1 INTRODUÇÃO**

A análise microbiológica da água baseia-se na técnica de determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes totais e termotolerantes nas amostras (Figura 1). As análises são conduzidas conforme as normas adotadas por cada país. No Brasil, seguem-se os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, da *American Public Health Association* (APHA).

A metodologia envolve a realização da prova presuntiva, seguida das provas confirmativas para coliformes totais e coliformes termotolerantes, assegurando maior precisão na detecção desses microrganismos indicadores. Essa técnica é aplicada à avaliação de águas destinadas ao consumo humano, recreação, uso industrial em processos de preparo de alimentos e bebidas, bem como à irrigação em áreas agrícolas.

#### **1.2 FUNDAMENTO DA TÉCNICA**

A prova presuntiva baseia-se na inoculação da amostra no meio de cultura Caldo Lauril Sulfato de Sódio. A presença de bactérias coliformes é indicada pela formação de gás nos tubos, resultado da fermentação da lactose por bactérias Gram-negativas. O meio apresenta caráter seletivo devido à presença do surfactante aniônico lauril sulfato, que atua sobre a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, inibindo seu crescimento. O número de tubos positivos permite estimar a concentração de bactérias na amostra por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP).

A prova confirmativa para coliformes totais consiste na inoculação dos tubos presuntivos positivos em Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2,0%. Após incubação, a formação de gás confirma novamente a fermentação da lactose. Esse meio contém bile bovina e o corante verde brilhante, derivados do trifenilmetano, que conferem seletividade para bactérias Gram-negativas do grupo dos coliformes, incluindo os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. Membros desse grupo podem ocorrer em diferentes ambientes, como solo, água, vegetais, além de comporem a microbiota intestinal humana e de outros animais.

A confirmação para coliformes termotolerantes é realizada pela inoculação de alíquotas dos tubos positivos para coliformes totais no meio Caldo *Escherichia coli* (EC), específico para essa espécie. Entre os coliformes presentes em fezes, a grande maioria

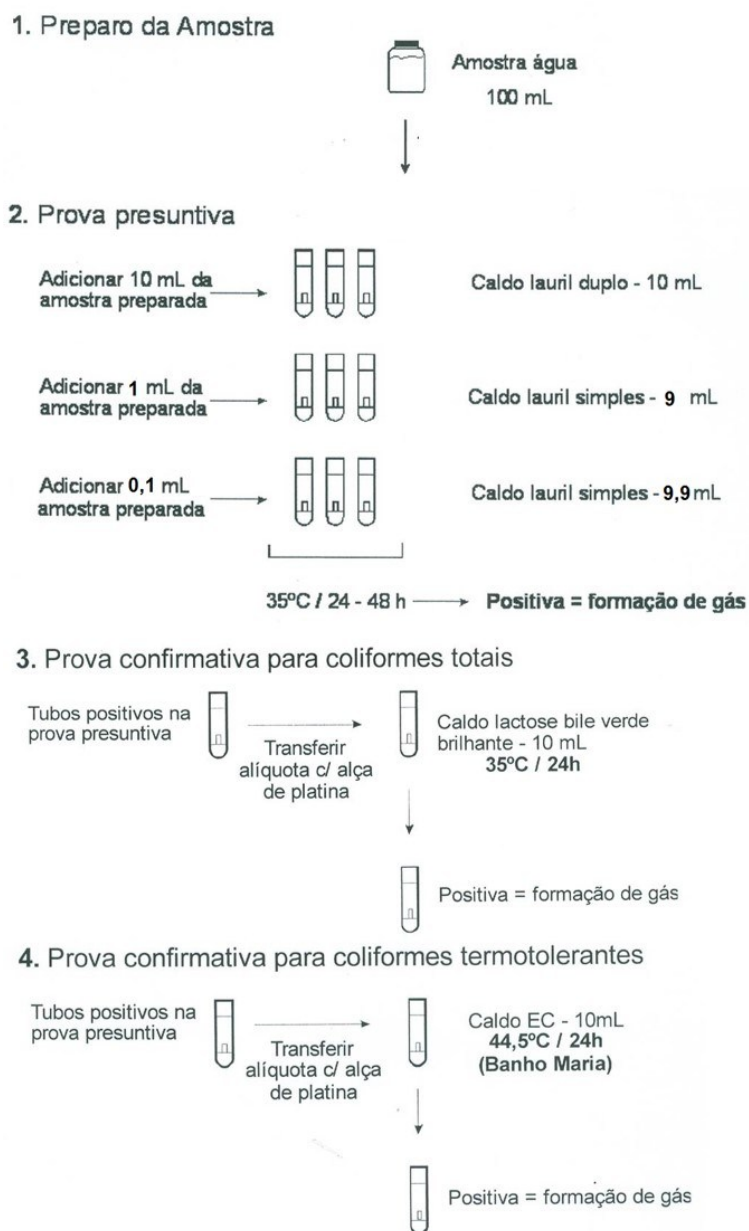


**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena – EEL**

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053**

corresponde a *Escherichia coli* (aproximadamente 95%), o que torna esse meio altamente seletivo para a detecção de coliformes de origem fecal.

Figura 1: Esquema geral da análise microbiológica da água para Bactérias Coliformes Totais e Bactérias Coliformes Termotolerantes





**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053**

## **2 -OBJETIVOS**

Promover a análise microbiológica de água quanto a presença de Bactérias Coliformes Totais e Bactérias Coliformes Termotolerantes em amostras de diferentes fontes.

## **3 - PROCEDIMENTO**

### **3.1 PROVA PRESUNTIVA**

1. Inocular o volume de 10,0 mL da amostra de água na série de 3 tubos contendo meio Caldo Lauril Sulfato de Sódio, em concentração dupla.
2. Inocular o volume de 1,0 mL da amostra na primeira série de 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato de Sódio em concentração simples.
3. Na segunda série de tubos com meio Caldo Lauril Sulfato de Sódio em concentração simples, inocular 0,1 mL da amostra de água
4. Incubar os tubos a 35 °C, por 24 a 48 horas.
5. A suspeita de coliformes totais é indicada pela formação de gás nos tubos de Durham (mínimo 1/10 do volume total).
6. Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

### **3.2 PROVA CONFIRMATIVA PARA COLIFORMES TOTAIS**

1. Repicar cada tubo positivo da prova presuntiva, para os tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% lactose.
2. Incubar os tubos a 35 °C por 48 horas. A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham).



**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053**

**3.3 PROVA CONFIRMATIVA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES**

1. Repicar cada tubo positivo do Caldo Verde Brilhante Bile obtido na prova presuntiva, para tubo contendo Caldo EC.
2. Incubar os tubos a 44°C por 48 horas. A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham).

**RESULTADOS:**

O resultado deve ser interpretado a partir da combinação entre os resultados dos diferentes testes (testes presuntivos, confirmativos para coliformes totais e coliformes termotolerantes), incluindo a determinação do Número Mais Provável (NMP) através da tabela padronizada abaixo. Certificar se a tabela de NMP usada é a indicada para o caso específico das diluições empregadas. Expressar o valor obtido em NMP/100 mL da amostra analisada.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena – EEL**

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053**

Tabela 1: Relação do número tubos positivos na prova e o Número Mais Provável (NMP) de células bacterianas por 100mL

Tubos Positivos por:			NMP para 100 mL
10 mL	1 mL	0,1mL	3 tubos
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	30
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>2400



**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053**

**Registro dos resultados da prova presuntiva**

<b>Tubos</b>	<b>Positivos</b>	<b>NMP/100mL</b>
10mL		
1mL		
0,1mL		

**5- ANEXO**

**PREPARO DOS MEIOS**

**1. Caldo Lauryl Duplo**

Lauryl Triptose	3,5 g
Água Destilada	50,0 mL

**2. Caldo Lauryl Simples**

Lauryl Triptose	3,5 g
Água Destilada	100,0 mL

**3. Caldo Lactose Verde Brilhante**

Lactose Verde Brilhante	4,0 g
Água Destilada	100,0 mL

**4. Caldo EC**

Caldo EC	4 g
Água Destilada	100,0 mL