



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

1 INTRODUÇÃO

A análise microbiológica da água está fundamentada na técnica de determinação do Número Mais Provável (NMP) de Bactérias Coliformes Totais e Bactérias Coliformes Termotolerantes nas amostras (Figura 1). As análises são realizadas segundo normas adotadas por cada país. No Brasil, os procedimentos utilizados são os do *Standard methods for examination of water and wastewater*, da *American Public Health Association* (APHA). As análises microbiológicas da água empregam a prova presuntiva, seguida pelas provas confirmativas para coliformes totais e termotolerantes.

A técnica aplica-se a água potável utilizada pela população, na recreação, no uso industrial nos processos de preparo de alimentos e bebidas, assim como, nas irrigações de áreas agrícolas.

1.2 FUNDAMENTO DA TÉCNICA

A prova Presuntiva tem como base a inoculação da amostra no meio de cultura Caldo Lauril Sulfato de Sódio. A presença de bactérias na amostra é evidenciada pela formação de gás nos tubos, que indica a fermentação da lactose por bactérias Gram-negativas. O meio é seletivo devido a presença do surfactante aniônico, que atua na membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas, inibindo o seu crescimento. O número de tubos positivos permite a estimar a quantidade de bactérias presentes na amostra, através da técnica de Número Mais Provável.

A prova Confirmativa para confirmar a presença de coliformes totais na amostra é realizada através da inoculação dos tubos positivos da fermentação de lactose em Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2,0%. Após incubação dos tubos em estufa, a presença de gás confirma a fermentação da lactose. O meio de cultura apresenta na sua composição bile bovina e o corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), específico para bactérias Gram-negativas do grupo dos coliformes (gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*). Membros do grupo dos coliformes podem ser encontrados em diversos ambientes como solo, água, vegetais e o intestino normal do homem e outros animais.

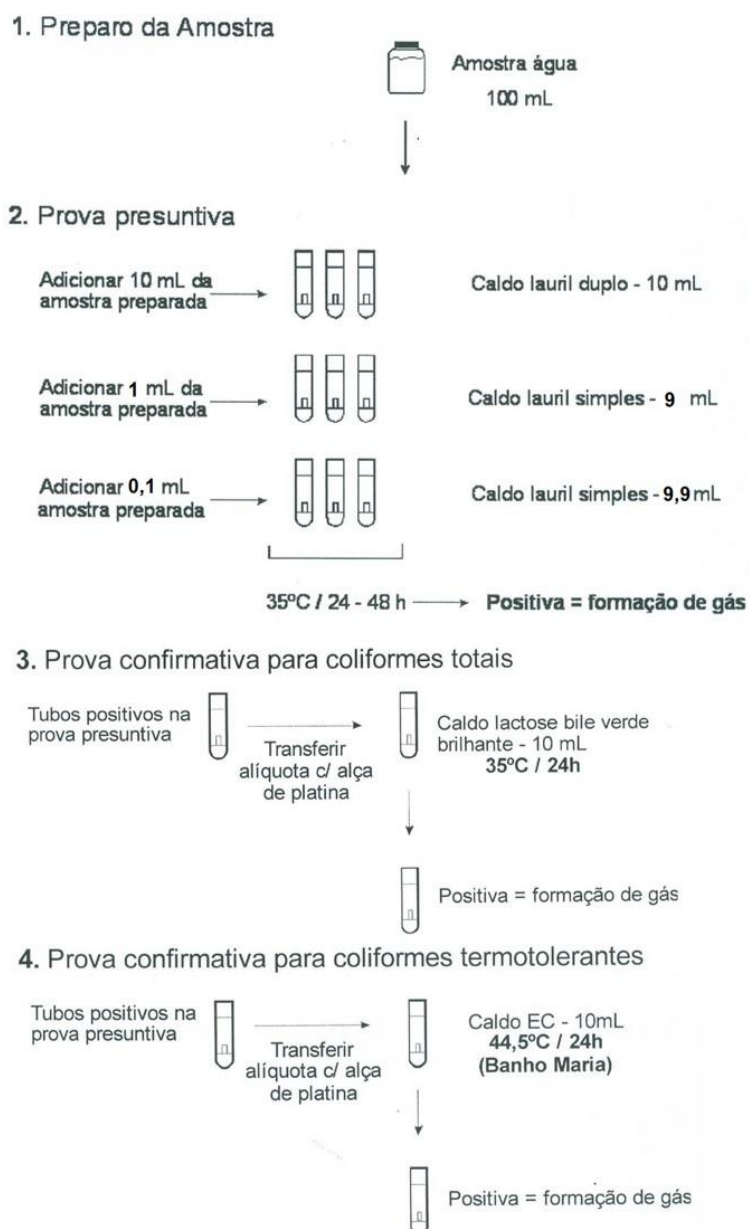


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é realizada inoculando amostra dos tubos positivos da prova para coliformes totais para o meio caldo *Escherichia coli* (EC), específico para esta espécie. Dentre os coliformes presentes nas fezes, a grande maioria é *Escherichia coli* (95%).

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





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

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- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Material

- Caldo Lauril Sulfato de Sódio
- Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2,0%
- Caldo Escherichia coli - EC
- Tubos de Ensaio
- Tubos de Durhan
- Amostra de Água

Equipamento

- Câmara de Fluxo laminar
- Autoclave
- Balança analítica
- Estufas com temperatura controlada a 35 °C e 44,5 °C.

4 - PROCEDIMENTO

4.1 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 Durhan (mínimo 1/10 do volume total).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

6. Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

4.2 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).

4.3 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 Microbiologia Experimental - LOT 2050

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena - EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Registro dos resultados da prova presuntiva

Tubos	Positivos	NMP/100mL
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