



Prática 10: Análise da qualidade de água utilizando indicadores bacteriológicos

Introdução:

A qualidade da água das praias necessita ser monitorizada regularmente, de modo a se certificar que a mesma é própria para os banhistas. Vários parâmetros são necessários analisar nestas águas, incluindo os parâmetros microbiológicos (ver Directiva Comunitária nº76/160/EEC). Como sabemos vários patogénios podem ser transmitidos ao homem através da água (ver Ali *et al.* 2004; Noble *et al.* 2003). Nas publicações da Organização Mundial de Saúde de 1998 e 2000 (WHO, 1998, 2000) podem igualmente encontrar-se informações sobre os patogénios transmitidos através da água. De modo a avaliar a qualidade microbiológica de uma dada massa de água, analisam-se as concentrações das chamadas bactérias indicadoras. Estas bactérias não são em princípio bactérias patogénicas, mas visto estarem presentes em locais onde existe contaminação antropogénica, pressupõe-se que nesses locais se encontrem também microrganismos patogénicos.

Usualmente as bactérias indicadoras monitorizadas em águas de praias são:

- Coliformes Totais (TC)
- Coliformes Fecais (FC)
- Enterococci (EC)

Para a pesquisa destes indicadores são utilizados meios de cultura selectivos e metodologias padronizadas, de modo a obter comparabilidade dos resultados obtidos. Os valores das bactérias indicadoras em termos de CFUs/ml, estão tabelados por directivas comunitárias e nacionais, e podem ser consultados em Shibata *et al.* (2004) e Bordalo (2003).

Metodologia para análise bacteriológica de água do mar, pelo método MF (Filtração por Membrana):

1. Amostragem:

- Quantidade de água a colher: 500 ml de cada local de colheita, os locais de colheita serão: (A) a meio da praia, entrando na água até cintura colher a água a cerca de 30 cm da superfície; (B) no extremo da praia junto ao paredão do complexo do Lido, colher a amostra de água igualmente a 30 cm de profundidade.

Parâmetros a anotar: data e hora de colheita, maré, temperatura da água, aspecto da água, condições atmosféricas.

Toda a água será filtrada através de filtros de membrana, com auxílio de uma rampa de filtração. A amostra A será distribuída por 3 funis, no 1º filtrar 200ml, no 2º 200ml e no 3º 100ml. Após a filtração retirar o filtro com auxílio da pinça e colocar em cima do meio selectivo, um filtro por meio. O 1º e 2º nos meios KF e Lauril, o 3º no mFC. Proceder do mesmo modo para a amostra B.

2. Determinação de Enterococci fecais:

- Isolamento em meio KF Streptococcus agar (OXOID CM701)
- Filtrar a amostra de água através do filtro (0.45 µm) de membrana esterilizada. Manejar o filtro com pinças esterilizadas.
- Incubar o filtro em cima do meio, a 35-37 °C por 48h.
- Se crescerem colónias vermelhas, castanhas ou rosas, reacção (+), proceder ao teste confirmatório por,
 - Isolamento de um nº representativo de colónias e sementeira em meio Bilis Esculina Azide Agar (BEAA), ou transferência do filtro para este meio. Este meio precisa de ser pré-aquecido a 44 °C. A temperatura de incubação é também 44 °C por 1h a 48h.
 - Colónias castanhas ou pretas rodeadas de halos negros, reacção (+),
 - Efectuar teste da catalase, se (-) confirma-se a presença de Enterococci fecais.

3. Determinação de Coliformes Totais (*E. coli*, *Citrobacter*,...)

- Incubar o filtro em meio "Membrane Lauryl Sulphate Agar" (OXOID) por 24h, a 37°C.
- Se crescerem colónias amarelas, efectuar teste da Oxidase (com os bastonetes da Oxidase da OXOID, tocando com a ponta acastanhada do bastonete na colónia).
- Se Oxidase (-) (ponta do bastonete não muda de cor), então "coliformes totais"

"Coliformes Totais" são os aeróbios e anaeróbios facultativos, gram (-), sem formação de esporos, com forma de bastonete, fermentativos da lactose c/produção de gás e ácido após 24-48h a cerca de 37°C e a 44°C em 48h.

- Isolar colónias e inocular meio "Kliger Iron Agar" (OXOID), (o "slant" e o "butt" do meio) utilizando uma ansa recta. Observar a actividade fermentativa e a produção de gás.

4. Determinação de Coliformes Fecais: (Os coliformes das fezes)

- Incubar o filtro em meio m-FC (DIFCO) com solução de 1% de ácido rosólico em 0.2N NaOH (já foi adicionado o ácido rosólico previamente).
- A incubação do filtro faz-se por 24-26h a 44-45°C.
- Se colónias azuis, reacção (+), indica a presença de coliformes fecais. Coliformes não fecais (do ambiente) dão colónias cinzentas ou creme. *E. coli* atípica pode dar colónias amarelo-pálido.

Resultados e Discussão:

Os resultados obtidos, após os períodos de incubação e testes confirmatórios, serão expressos em “nº de bactérias/100ml” de acordo com as normas relativas a análise microbiológica de água. A contagem das colónias será feita com auxílio de uma lupa, quando necessário.

Bibliografia para amostragem e resultados:

Bordalo, A.A. (2003). Microbiological water quality in urban coastal beaches: the influence of water dynamics and optimization of sampling strategy. *Water Research* 37: 3233-3241.

Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à qualidade das águas balneares. COM (2002) Bruxelas.

Shibata, T., Solo-Gabriele, H.M., Fleming, L.E., Elmir, S. (2004). Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water Research* 38: 3119-3131.

WHO (1999) Health-based monitoring of recreational waters: the feasibility of a new approach (The Annapolis Protocol), Geneva, 1999.

WHO (2000). *Monitoring Bathing Waters: A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes.*