

NAO PODE SER
EMPRESTADO NEM
XEROCOPIADO

ARQUIVO TECNICO

0202
Sa55d(RCET)
035649



26564



035649



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
DIRETORIA DE TREINAMENTO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Departamento de Treinamento para Ações Ambientais
TAP/TAPE/TAPT

DESINFECÇÃO DA ÁGUA:
APLICAÇÃO, NA PREVENÇÃO DA CÓLERA

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA Prof. Dr. Lucas Nogueira Garcez
Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros
05489-900 - SÃO PAULO - BRASIL

São Paulo
Maio/1993

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA Prof. Dr. Lucas Nogueira Garcez
Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 346 - Pinheiros
05489-900 - SÃO PAULO - BRASIL

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Autoras:

Dra. Petra S. Sanches
Biól. Antonia Guedes M. Stedtler

São Paulo
Maio/1993

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. APLICAÇÃO DA PESQUISA DE <i>Vibrio cholerae</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA	04
3. DEFINIÇÕES	05
4. COLETA DE AMOSTRAS	07
4.1. Planejamento das atividades	07
4.2. Técnicas de coleta	10
4.2.1 Coleta de amostras pela Técnica de Moore modificada (mecha de gaze).....	11
4.2.2 Coleta de amostras líquidas	16
5. VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA DO PONTO DE VISTA MICROBIOLÓGICO	21
5.1. Indicadores bacteriológicos de contaminação	22
5.2. Aplicação das análises bacteriológicas	24
6. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁGUAS	25
6.1. Introdução	25
6.2. Coleta de amostras para análises microbiológicas	25
PADRÕES BACTERIOLÓGICOS DE QUALIDADE DA ÁGUA	33

1 - INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença intestinal bacteriana aguda, causada pelo **Vibrio cholerae** O1, biotipo clássico (cholerae) ou eltor, que geralmente ocorre em surtos explosivos, e caracteriza-se por diarreia aquosa abundante, vômitos ocasionais, rápida desidratação, acidose, câimbras musculares e colapso respiratório, podendo levar o paciente a morte num período de 4 a 48 horas (casos não tratados).

Os efeitos da cólera são devido a ação de uma exotoxina (enterotoxina), produzida pelo **V. cholerae** que atua nas células epiteliais da mucosa intestinal fazendo com que a mesma se torne extremamente permeável, provocando perda de grande quantidade de líquidos e eletrólitos.

Devido a grande perda de líquidos, o sangue torna-se viscoso, prejudicando o funcionamento de vários órgãos vitais.

A susceptibilidade e a imunidade à cólera é muito variável, sendo que a acloridria gástrica favorece a sobrevivência dos vibriões no estômago. Comumente afeta mais a população adulta e crianças acima de 2 anos de idade.

As infecções assintomáticas e as formas benignas (diarreias discretas) são muito mais comuns do que os casos graves, e esses casos são importantes na permanência do bacilo na comunidade e meio ambiente.

A persistência da doença nas zonas endêmicas é facilitada pelos indivíduos infectados que eliminam o vibrião durante uma ou duas semanas, pela elevada proporção de infecções assintomáticas e curta imunidade pós-infecciosa, o que possibilita frequentes reinfecções.

Durante séculos, a cólera se limitou, sob forma endêmica, à região dos Rios Ganges e Brahmaputra na Índia e Bengala, e no período de 1817 a 1923, ocorreu a expansão desta doença por quase todo o mundo, constatando-se a ocorrência de seis pandemias distintas, envolvendo a Europa, Ásia, Norte da África e Américas.

A sétima pandemia de cólera, que se deve ao *Vibrio cholerae*, biotipo eltor, teve início em 1961 em Celebes, na Indonésia, tendo sido responsável por cerca de 1.140.000 casos de cólera durante o período de 1970 a 1989. Embora durante a década de 1980 o número de casos de cólera relatados tenha diminuído anualmente, o número de países afetados triplicou, e em janeiro de 1991 a sétima pandemia chegou à América Latina, através de um surto epidêmico de cólera que ocorreu no Peru, causado pelo biotipo eltor sorotipo Inaba, tendo sido reportados posteriormente casos em vários países da América do Sul (Chile, Equador, Colômbia, Brasil, etc), sendo a primeira vez neste século, em que a doença atinge o Brasil.

A propagação da doença, nos vários países deve-se principalmente às características do biotipo eltor que causa muitos casos de infecções assintomáticas e leves, falta de uma vacina eficaz, rápidos meios de transporte, turismo, fluxo migratório procedentes de áreas endêmicas, más condições de saneamento e principalmente falta de água potável.

A cólera é uma doença de transmissão hídrica e ocorre primariamente através da ingestão de água contaminada e secundariamente por alimentos contaminados com fezes ou vômitos de indivíduos infectados, manipuladores assintomáticos de alimentos, contacto direto com fezes do doente, ou ainda por vetores (moscas e baratas).

Considerando-se que o principal meio de propagação da cólera é a água, em épocas de provável surgimento de epidemias, o monitoramento e controle dos principais cursos d'água superficiais (rios, represas, lagos, etc.) e águas subterrâneas (poços, nascentes, etc) deve ser aumentado e merecem cuidadosas investigações, visando sua proteção, e a adoção de medidas preventivas à propagação da doença.

A sobrevivência do **Vibrio cholerae** no meio aquático, é de elevado interesse epidemiológico, uma vez que a água constitui principal fonte de disseminação da cólera e na possível manutenção deste agente etiológico no meio ambiente.

A viabilidade do **Vibrio** no meio aquático é diretamente influenciado pelo pH, temperatura e pressão osmótica, sais, matéria orgânica, bactérias, podendo sobreviver por durante vários dias ou semanas.

Estudos realizados pela CETESB, em convênio com a OMS, em águas do Estado de São Paulo, demonstraram que a sobrevivência do **V. cholerae** em água do mar foi de 6 a 26 dias, em água doce 6 a 19 dias, e de 5 a 12 dias em água de esgoto. Constatou-se também neste estudo, que em água contaminada sua sobrevivência foi menor e as temperaturas de 10°C e 25°C foram as mais favoráveis.

Dependendo do tipo de água, seu período de sobrevivência pode ser aumentado, existindo dados na literatura internacional que citam até 60 dias.

O reservatório natural do **V. cholerae** O1 não é ainda bem conhecido. Embora tem-se assumido ser o homem, evidências recentes tem sugerido que o ambiente aquático pode ser o reservatório natural dessas bactérias e estaria associado à presença de quitina presente nas carapaças de vários animais marinhos e plantas aquáticas.

Considerando-se o papel fundamental das águas como fonte de disseminação do **Vibrio cholerae**, a pesquisa dessa bactéria no meio aquático é de suma importância para localizar e acionar medidas de emergência para eliminar focos de contaminação e rastrear a origem da contaminação em regiões vulneráveis. Dessa forma, acreditamos que os profissionais dos Laboratórios de Microbiologia Ambiental devam estar adequadamente treinados para realizar o diagnóstico laboratorial em amostras de águas contribuindo com as autoridades de Saúde Pública e Meio Ambiente para o controle da disseminação da epidemia de cólera no Brasil, que no momento atinge grandes dimensões.

2 - APLICAÇÃO DA PESQUISA DE **V.cholerae** EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

A pesquisa de **V. cholerae** em amostras de água pode gerar informações que se aplicam a diferentes finalidades específicas, a saber:

- avaliar a qualidade de corpos d'água receptores de despejos industriais, domésticos e hospitalares;
- avaliar a eficiência dos processos de tratamento de água de esgoto e lixiviado de resíduos sólidos na remoção deste patógeno;
- avaliar possíveis fontes poluidoras e riscos de contaminação por **V. cholerae** no caso de águas utilizadas para fins recreacionais, inclusive águas marinhas;
- avaliar a qualidade de águas destinadas à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, a aquicultura de espécies destinadas à alimentação humana ou animal, à dessedentação de animais, etc.;
- localizar focos de contaminação de **Vibrio cholerae**, especialmente em pontos críticos do agente, tais como em portos, aeroportos, estações ferroviárias, rodoviárias e outros;

- obter dados mais completos sobre determinadas fontes de poluição em áreas específicas e relacionar com os inquéritos epidemiológicos.

3 - DEFINIÇÕES

Epidemiologia - é o estudo das condições de saúde e da ocorrência de doenças nas populações, visando a interceptação das causas que as determinam. De uma forma geral é a ciência do acontecer da doença;

Endemia - Termo usado para definir a incidência de uma doença numa coletividade dentro dos limites habituais explicáveis pela ação casual dos fatores que favorecem ou desfavorecem sua ocorrência. Em outras palavras é a ocorrência habitual de uma doença ou de um agente infeccioso em determinada área geográfica;

Epidemia - Termo usado para definir a ocorrência de uma doença em uma população em número de casos que ultrapassa a incidência esperada pelas variações casuais. Quando a área geográfica é restrita e o número de pessoas é pequeno, costuma-se usar o termo "surto";

Pandemia (gr. **pan**, todo e **demos**, povo) - Termo usado para definir uma epidemia que atinge grande número de pessoas de uma vasta área geográfica (um ou mais continentes);

Vibrio cholerae - Bacilos gram-negativos, ligeiramente encurvados, com 0,5 a 0,8 μm de diâmetro por 1,4 a 2,6 μm de comprimento. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis por um flagelo polar, não produzem H_2S e são oxidase positivos. Fermentam a glicose, sacarose, manitol e maltose sem produção de gás. Descarboxilam a lisina e ornitina, e são arginina dehidrolase negativa. Reduzem nitrato a nitrito, produzem gelatinase, quitinase e indol, crescem à 40°C e toleram alcalinidade elevada (pH 9,2). Não utilizam inositol, salicina, D-sorbitol, L-alanina, L-tirosina e putrescina, e são sensíveis ao agente vibrostático 0129. Não requerem o íon Na^+ para crescimento, mas

são capazes de crescer em concentrações de até 3% de NaCl. Segundo Smith (1979) o **Vibrio cholerae** pode ser subdividido em 72 sorogrupos baseado nas características sorológicas do antígeno O, sendo o sorogrupo O1, o responsável pela cólera. O **Vibrio cholerae** O1 inclui os sorotipos Ogawa e Inaba (e Hikojima) e pode ser dividido em biotipo clássico (ou cholerae) e eltor.

A diferenciação dos biotipos é baseada nas provas de hemólise de eritrócitos de carneiro, hemaglutinação de eritrócitos de galinha, fermentação butileno glicólica (VP), sensibilidade à polimixina B(50U) e bacteriófagos específicos.

Cólera - Infecção intestinal bacteriana aguda, que se caracteriza por início abrupto, diarreia aquosa abundante, de cor esbranquiçada, tipo água de arroz, com odor de peixe, sem muco ou sangue. Nos casos típicos ocorre grande perda de água e eletrólitos, vômitos, rápida desidratação, acidose, câimbras musculares e colapso respiratório. Nos casos graves, o indivíduo pode perder pela evacuação de 1 a 2 litros de água por hora, e a letalidade é elevada (50% ou mais) nos casos não tratados. Em pacientes tratados é inferior a 1%. O período de incubação vai de poucas horas a 5 dias (usualmente 1 - 3 dias). A febre é baixa, no entanto pode não ocorrer.

São múltiplas as manifestações decorrentes da profunda desidratação com distúrbios metabólicos e hidroeletrólíticos (sede intensa, perda rápida de peso, perda de turgência da pele, nos dedos torna-se enrugada e seca (mão de lavadeira), olhos encovados, prostração, olhar parado e vago, voz sumida).

A sintomatologia de cólera é variável podendo se verificar casos de cólera leves, clinicamente similares a outros tipos de diarreias e casos assintomáticos.

4. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta de amostras pode parecer uma tarefa relativamente simples, porém, mais do que mergulhar uma garrafa na água para retirar uma amostra, torna-se necessário obter uma amostra representativa e estabilizada do corpo de água amostrado e das condições locais que podem interferir, tanto na interpretação dos dados, quanto nas próprias determinações laboratoriais. Assim, para assegurar a representatividade e confiabilidade das amostras e subsidiar a elaboração de relatórios sobre qualidade de água é indispensável a participação de técnicos adequadamente treinados e motivados. Esses técnicos precisam observar e anotar quaisquer fatos ou anormalidades que possam interferir com as características da amostra (cor, odor, ou aspecto estranho, presença de algas, óleos, corantes, material sobrenadante, peixes ou outros animais aquáticos mortos). Devem ainda ter condições para estabelecer pontos de amostragem alternativos e outros parâmetros complementares para a caracterização das águas.

4.1 Planejamento das atividades

O planejamento correto das atividades de campo é de importância fundamental para o sucesso dos trabalhos e deve envolver os seguintes aspectos:

- seleção de itinerários racionais, observando-se os acessos, o tempo para coleta e preservação das amostras e o prazo para envio das mesmas aos laboratórios (obedecendo a validade de estabilidade das mesmas, e a capacidade e horário de atendimento dos laboratórios). Muitos programas necessitam de vários dias para serem desenvolvidos, o que exige remeter as amostras coletadas diariamente aos laboratórios por despachos rodoviários ou aéreos, nesses casos, deve-se planejar as coletas calculando a localização e os horários das transportadoras;

- verificação da existência de eventuais características locais nos pontos de coleta que exigem equipamentos ou cuidados especiais o que permitirá a sua adequada seleção e preparo. Isto vale especialmente para o caso de coletas com barcos, coletas de sedimentos ou peixes e coletas em locais de difícil acesso, ou com alto risco de acidentes (rios caudalosos, mar, pontes de tráfego intenso, amostragem em indústrias, etc.);
- preparação de listas contendo o tipo e a qualidade de equipamentos e materiais necessários aos trabalhos (frascos para o armazenamento das amostras, caixas para embalagens, garrafas de coleta, cordas, barcos, motores, preservantes químicos, fichas de coleta, equipamento de segurança, etc.). Recomenda-se preparar uma listagem para evitar esquecer algum item. É conveniente levar alguns frascos excedentes para o caso de se detectar alguma anomalia que necessite de amostragem adicional, ou de perda dos frascos;
- verificação da disponibilidade e funcionamento adequado do material necessário à coleta e envio da programação de coleta e demanda de análise aos laboratórios e certificação de que podem atender ao programa.

Embora pareça óbvio, convém assegurar-se que o pessoal envolvido na coleta seja devidamente treinado nas técnicas específicas de amostragem e preservação de amostras, medidas de segurança, manuseio dos equipamentos de campo e conhecimento da localização exata dos pontos de coleta. Um coletor bem treinado, consciente e observador é de importância fundamental para consecução dos objetivos dos programas de caracterização das águas.

Recomendações Gerais

A técnica a ser adotada para a coleta de amostras depende da matriz a ser amostrada (água superficial, subterrânea, encanada, residuária, sedimento de fundo, biota aquática), do tipo de amostragem (amostra simples ou composta) e, também da natureza do exame a ser solicitado (análises físico-químicas, microbiológicas, biológicas ou radiológicas). Entretanto, independente dessas características há os seguintes cuidados a serem tomados:

- para minimizar a contaminação da amostra convém coletar as mesmas com a boca do frasco de coleta contra a corrente;
- coletar volume suficiente de amostra para eventual necessidade de se repetir alguma análise no laboratório;
- fazer todas as determinações de campo em alíquotas de amostra separadas das que serão enviadas ao laboratório, evitando-se, assim, o risco de contaminação;
- empregar somente os frascos e as preservações recomendadas para cada tipo de determinação, conforme detalhes apresentados mais adiante, verificando se todos os reativos para preservação estão adequados para o uso, em caso de dúvida, substituí-los;
- verificar, também, a limpeza dos frascos e demais materiais de coleta (baldes, garrafas, pipetas, etc.);
- a parte interna dos frascos e do material da coleta, assim como os batoques e tampas, não podem ser tocados com a mão ou ficar expostos ao pó, fumaça e outras impurezas (gasolina, óleo e fumaça de exaustão de veículos podem ser grandes fontes de contaminação de amostras). Cinzas e fumaça de cigarro podem contaminar fortemente as amostras com metais pesados e fosfatos, entre outras substâncias. Recomenda-se, portanto, que os coletores mantenham as mãos limpas, ou usem luvas plásticas e não fumem durante a coleta das amostras;
- imediatamente após a coleta e preservação das amostras, colocar as mesmas ao abrigo da luz solar, preferencialmente

- em caixas de isopor com gelo;
- manter registro de todas as informações de campo, preenchendo uma ficha de coleta por amostra, ou conjunto de amostras da mesma característica, contendo os seguintes dados:
 - . número de identificação da amostra;
 - . identificação do ponto de amostragem e sua localização (profundidade);
 - . data e hora da coleta;
 - . tipo de amostra (efluente industrial, água de rio, mar, potável, etc.);
 - . medidas de campo (temperatura ar/água, pH, condutividade, etc.);
 - . eventuais observações de campo;
 - . condições meteorológicas nas últimas 24 horas e que possam interferir com a qualidade de água (chuvas);
 - . indicação dos parâmetros a serem analisados no laboratório;
 - . nome do responsável pela coleta;
 - . nome do programa e do coordenador, com telefone para contato.

4.2. Técnicas de Coleta

Os locais de colheita de amostras devem ser estabelecidos em pontos das redes coletoras de esgotos, Estações de Tratamento, Estações Elevatórias e poços de visita, que recebam esgotos de partes representativas da população; nas possíveis vias de entrada do *V. cholerae*, sobretudo portos e aeroportos, assim como estações ferroviárias e rodoviárias; nos córregos e rios, que recebem grande quantidade de despejos domésticos e também na água de abastecimento, principalmente quando há suspeita de uma contaminação que pode levar a um surto epidêmico.

Basicamente as amostras para pesquisa de *Vibrio cholerae*, podem ser obtidas de duas formas distintas, uma das quais

consiste na coleta de uma porção líquida enquanto que a outra, na instalação de uma mecha de gaze no local estabelecido, durante um determinado intervalo de tempo e posterior retirada.

4.2.1 Coleta de amostra pela técnica de Moore modificada (mecha gaze) (Procedimento).

A técnica de Moore tem sido amplamente utilizada para a pesquisa de *V.cholerae* em amostras de água de esgoto e águas superficiais. A principal vantagem deste método consiste na constante vigilância do líquido a ser estudado já que a medida em que se retira uma mecha, instala-se outra. Por outro lado, amostragens pontuais em que se obtém porções do líquido permitem espaços vazios entre uma coleta e outra, havendo, desta maneira, uma probabilidade menor de se isolar o *Vibrio cholerae*.

a) Preparo da mecha

Usar atadura de crepe ou gaze esterilizada. A atadura é dobrada 5 vezes no sentido do comprimento, e suas dimensões finais serão 23 cm de largura por 36 cm de comprimento. A partir da base inferior de 23 cm, cortam-se 5 tiras de 4,5 cm de largura e 26 cm de comprimento deixando-se, portanto, 10 cm na parte superior sem cortar, onde será fixado o fio de nylon (3m) para servir de suporte para a mecha. Embrulhar em papel "Kraft" e autoclavar a 121 °C durante 15 minutos (Fig. 1 e 2).

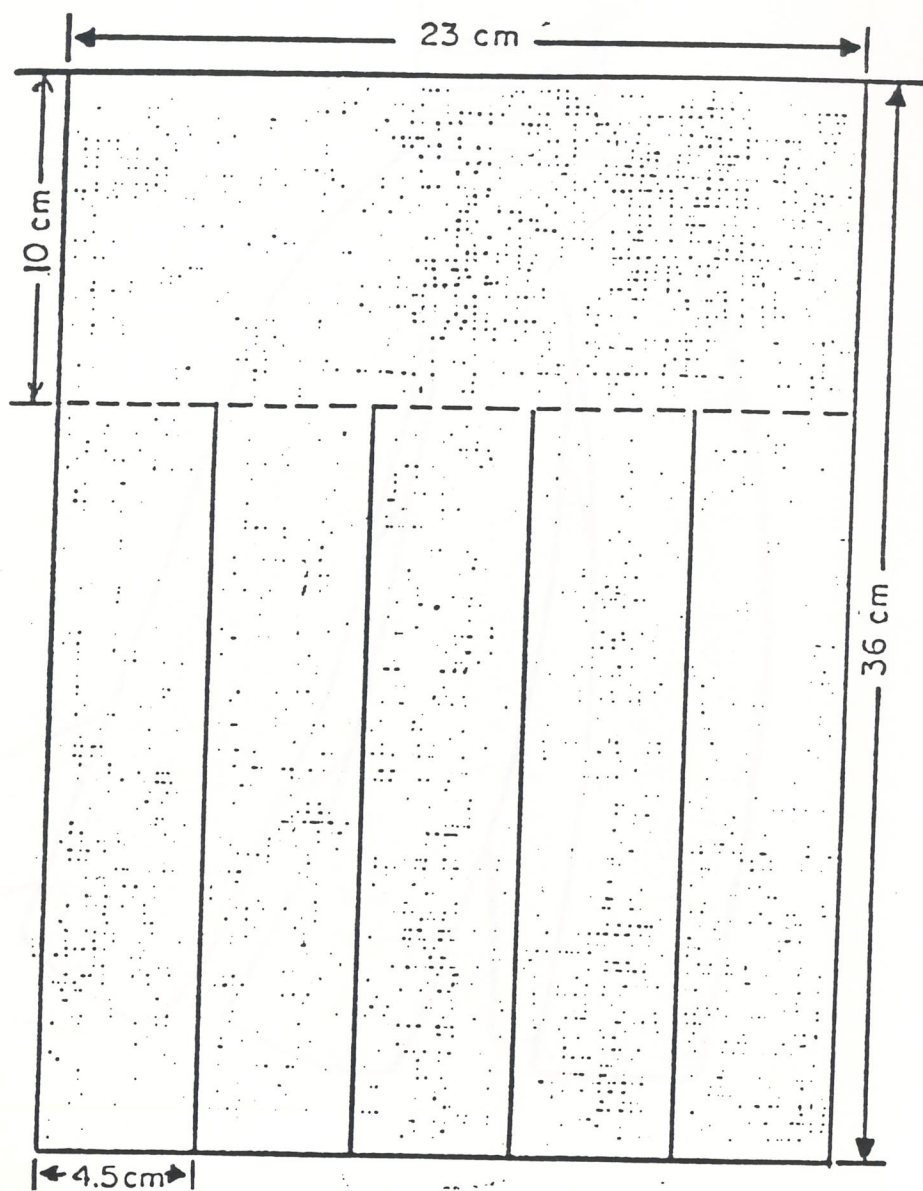
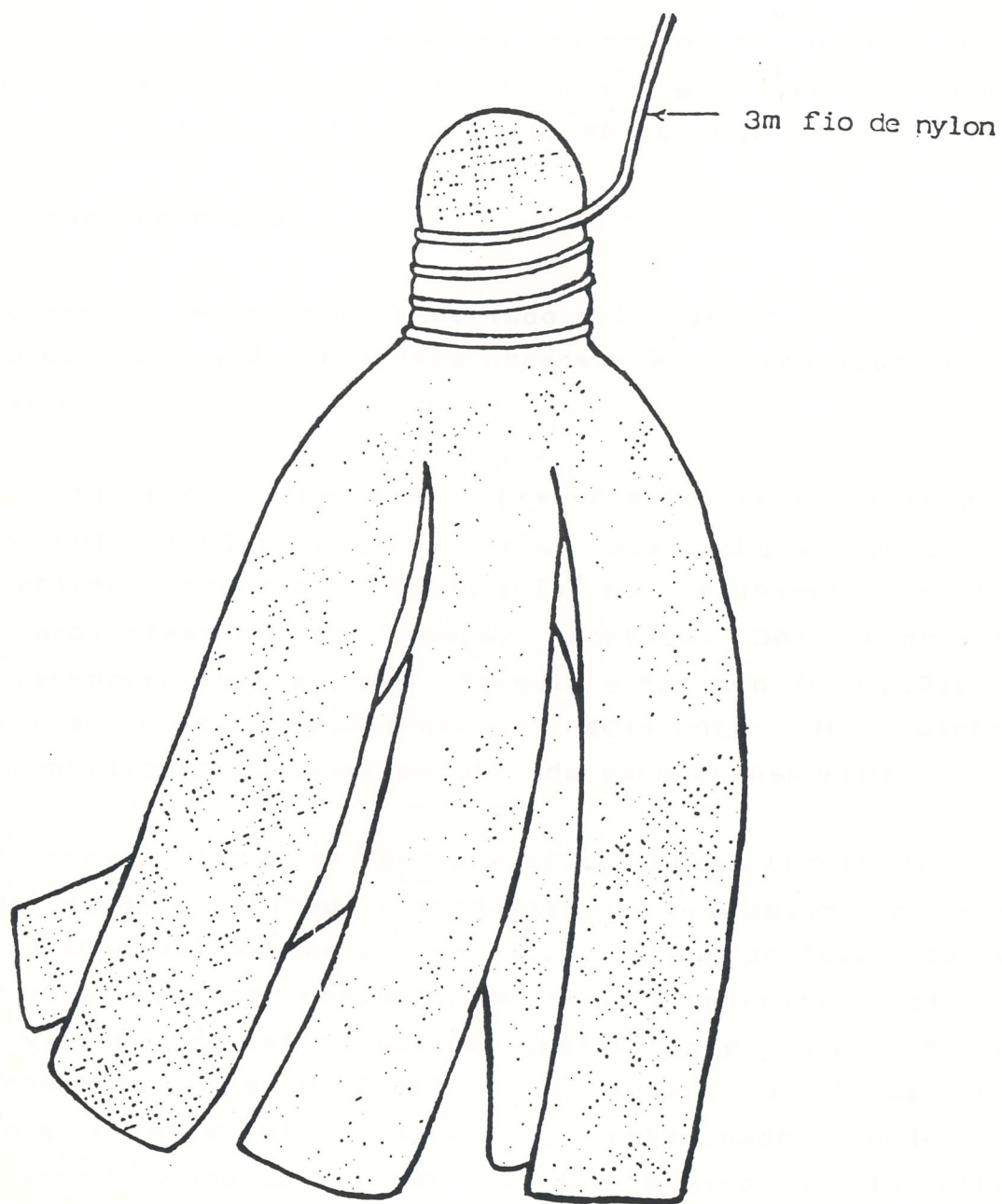


Figura 1 - Dimensões da mecha de Moore



**Figura 2 - Mecha de gaze pronta
(Técnica de Moore)**

b) Instalação de mecha

A mecha deverá ser instalada nos pontos de coleta, de forma que fique imersa no esgoto e o fio de nylon fique firmemente preso em uma estrutura fixa no ponto de coleta.

c) Retirada de mecha

Retirar a mecha após o período determinado (de 3 a 7 dias), tomando as medidas de segurança necessárias. Para isso proceder da seguinte forma:

- identificar as amostras, preenchendo corretamente a ficha de coleta: nº da amostra, data, local, chuvas, etc.
- retirar a mecha e introduzi-la no recipiente de coleta (saco plástico ou frasco), contendo 300 mL do meio de transporte Cary e Blair (Fórmula e Preparo ítem 8.3);
- fechar o saco plástico ou recipiente de coleta e acondicionar em caixa apropriada para transporte;

Obs.: A pessoa indicada para a execução desta tarefa deverá ser devidamente treinada e adequadamente protegida de modo a evitar problemas de contaminação. O uso de luvas, máscaras e botas deve ser obrigatório. Após a colheita retirar as luvas e colocar em solução desinfetante. Quando tampar o frasco ou fechar o plástico, não tocar com luvas sujas, pois o material é altamente contaminado e pode causar riscos à saúde do coletor ou do técnico de laboratório durante a manipulação da amostra.

d) Transporte e Preservação da Amostra (Mecha de gaze).

As amostras colhidas e transportadas em meio de Cary e Blair não necessitam de refrigeração, no entanto para municípios distantes onde o transporte é rodoviário, recomenda-se refrigerar a caixa de transporte, para manter uma temperatura aproximada de 10°C a 20°C. A utilização de sistemas de gelo reaproveitável acondicionados em plásticos tipo Camping, são adequados.

Amostras preservadas em meio de Cary e Blair devem ser processadas dentro do período de 24 a 72 horas após a coleta, salvo em condições e situações especiais.

e) Cuidados de Segurança

- a) Usar, para transporte dos sacos plásticos contendo as mechas, caixas com tampa de material adequado possível de ser autoclavado ou submetido a um processo de desinfecção adequado no laboratório.
- b) Após a colocação das mechas nos sacos plásticos, colocá-los individualmente dentro de outro saco plástico autoclavável.
- c) Após o uso o macacão de mangas compridas deve ser autoclavado, antes de ser encaminhado para a lavagem.
Obs.: Aventais utilizados na coleta deverão ser guardados em armários separados.
- d) Durante a colocação das mechas nos sacos plásticos, se ocorrerem respingos de esgoto na roupa de proteção do coletor, usar um desinfetante adequado (hipoclorito de sódio a 2%);

- e) Após a coleta, retirar a roupa de proteção e colocá-la em saco plástico, para posterior desinfecção no laboratório;
- f) Após a retirada das luvas desinfetar as mãos com um desinfetante adequado;
- g) Antes da remoção das luvas contaminadas após o manuseio da mecha, o coletor não deve tocar em outras partes do corpo.

f) Materiais de segurança necessários

- a) Capuz com visor plástico, de tecido adequado, descartável, para proteção da face contra respingos de esgoto, no momento da retirada da mecha e colocação no saco plástico com o meio de transporte;
- b) Macacão de mangas compridas, de tecido de algodão ou similar sobre o qual é colocado um avental de tecido adequado, descartável, com comprimento abaixo do joelho, para proteção da face anterior do corpo;
- c) Luvas descartáveis de cano longo, com elástico;
- d) Sapatilhas descartáveis, se necessário.

4.2.2 Coleta de amostras líquidas

A coleta de amostras de água deve ser realizada segundo Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/SEMA-1988), sendo que para as amostras de água doce deve ser adicionado duas colheres de chá de cloreto de sódio (aproximadamente 10g) por litro de amostra (concentração final de 1% de NaCl). A adição de cloreto de sódio proporcionará uma maior viabilidade das células de *V.cholerae* quando presentes.

Transporte e conservação

Após a coleta, as amostras de águas deverão ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível. O tempo ideal entre a amostragem e o início do exame é de 2 a 6 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. Para amostras que não poderão ser entregues no laboratório num período de 6 horas decorridos entre a colheita e o início do exame, deve-se ajustar o pH para 9,0-9,2 com hidróxido de sódio 1N (NaOH) e acrescentar telurito de potássio em concentração final de 1:200.000 (0,005g de telurito de potássio por litro de amostra). A finalidade da adição do telurito é inibir o desenvolvimento de outras bactérias que possam interferir na detecção do *V. cholerae*. Transportar sob refrigeração de 4 a 10°C.

Volume de amostra sugerido

O volume de amostra para a pesquisa de *V. cholerae* a ser concentrado, depende do tipo e característica da água a ser analisada, entretanto um volume mínimo é recomendado:

Água de esgoto	100 mL
Água superficial	5 litros
Água de consumo humano	10 litros

Águas tratadas - Preparo dos frascos de coleta

Para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1mL de uma solução de 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada

para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiossulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

Águas residuárias com metais - Preparo dos frascos de coleta

Para a coleta de amostras de águas poluídas (águas de esgoto e águas residuárias), suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc. deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiossulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiossulfato de sódio antes da adição.

O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiossulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

Segurança nos trabalhos de campo

Os trabalhos de campo realizam-se em condições e locais muito variados, fatores esses que aliados à coleta de amostras propriamente dita, oferecem riscos de acidentes. Para que esses riscos possam ser reduzidos, deve-se alertar e treinar os técnicos envolvidos, providenciando, ainda, os equipamentos de proteção adequados.

Seguem-se as atividades e substâncias que oferecem maiores riscos de acidentes e as recomendações para sua redução.

Transporte rodoviário

O próprio deslocamento do técnico e do equipamento ao local da coleta de amostras oferece grandes riscos. Não só os inerentes ao deslocamento propriamente dito, como os advindos do transporte concomitante do material de coleta, principalmente quando houver barco, equipamentos especiais, frascos de vidro e reagentes conservantes de amostras. Recomenda-se armazenar adequadamente os materiais, de preferência no porta-bagagens ou nas caçambas de pick-ups. Não se carrega esses materiais junto aos passageiros, ou quando o veículo já atingiu sua capacidade máxima de peso e volume. É importante o uso do cinto de segurança, mesmo em trajetos pequenos. Os frascos de vidro, principalmente aqueles usados para acondicionamento de reagentes conservantes, precisam ser evitados, utilizando-se preferencialmente frascos plásticos com batoques de vedação que impeçam derramamentos, devem estar calçados e protegidos adequadamente para não se quebrarem durante o transporte.

Localização dos pontos de coleta

Locais de difícil acesso e próximos a pontes, estradas movimentadas e locais de tráfego intenso de máquinas, etc., podem provocar acidentes, muitas vezes evitáveis. Uma ponte, por exemplo, pode constituir-se em caminho mais fácil para se atingir o meio de um rio e retirar a amostra; porém, na sua maioria, esses locais são muito movimentados, há estreitamento de pista e pequena faixa de segurança para pedestres, o que dificulta a parada da viatura e oferece riscos aos técnicos que executam as coletas. A coleta em pontes deve ser precedida da colocação de dispositivo de sinalização adequado que proporcione proteção contra veículos em trânsito.

O acesso aos pontos de coleta de rios, reservatórios, poços e nascentes, muitas vezes, através de trilhas ou picadas, em regiões com muita vegetação, oferece riscos de mordeduras de insetos e cobras ou outros animais.

Utilização de embarcações

A utilização de embarcações para coleta de amostras marinhas é muito freqüente. A verificação das condições gerais das embarcações, da carreta e dos seus acessórios é importante para se evitar atrasos e acidentes durante os trabalhos. Devem ser verificadas as condições de funcionamento do motor de popa, do tanque e mangueira de combustível, das baterias, tampões, sinalização noturna do barco e carreta, além de acessórios indispensáveis como remos, colete salva-vidas em número suficiente para toda a tripulação, âncora, extintor de incêndio, cordas, estepe para a carreta e peças de manutenção básica (pinos, velas, caixa de ferramentas, óleo para barco, etc.) A documentação do barco e da carreta deverá estar atualizada, em caso de vistoria pelas autoridades do trânsito, bem como a habilitação náutica dos operadores das embarcações.

Quando as embarcações necessitarem operar longe da costa ou da base de operações aconselha-se obter informações prévias sobre as condições meteorológicas da região, principalmente no caso de viagens de longa duração.

5. VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA DO PONTO DE VISTA MICROBIOLÓGICO

Petra S. Sanchez/Antonia G. Molina Stedtler

A preservação da qualidade das águas é uma necessidade universal que exige séria atenção por parte das autoridades sanitárias e órgãos de saneamento, particularmente em relação aos mananciais e água de consumo, visto que sua contaminação por excretas de origem humana ou animal pode torná-los um veículo de transmissão de agentes de doenças infecciosas e parasitárias. Por isso impõe-se a necessidade de exames rotineiros das mesmas para avaliação de sua qualidade do ponto de vista bacteriológico.

A pesquisa de microrganismos patogênicos na água requer procedimentos complexos e longo tempo para obtenção de resultados, o que inviabiliza sua aplicação em rotina, além de que normalmente encontram-se em número reduzido e sua chegada à água é intermitente, portanto para a avaliação de sua qualidade do ponto de vista bacteriológico é imprescindível a utilização de organismos indicadores de contaminação fecal.

Na microbiologia da água e de alimentos não é necessário, na maioria das vezes, chegar-se à identificação completa dos microrganismos envolvidos. Muitas vezes isto seria até inviável. A simples determinação de grupos de significado higiênico e sanitário já é suficiente, porém sua enumeração é primordial pois irá nos dar idéia do teor de contaminação e dos riscos de deterioração e ainda do índice de atividade dos microrganismos e a medida da biomassa, possibilitando sua comparação com padrões previamente fixados, e ainda, possibilitará a avaliação da eficiência dos processos naturais ou artificiais de tratamento em sua remoção ou minimização. Vários métodos para a enumeração de microrganismos na água têm sido propostos, sendo os métodos por cultivo ainda os mais utilizados.

A enumeração dos organismos viáveis mediante inoculação em tubos com caldo de cultura, meios sólidos (ágar) ou concentração em membrana filtrante e posterior incubação em meios de cultivo especiais são os métodos geralmente empregados em microbiologia da água.

5.1. INDICADORES BACTERIOLÓGICOS DE CONTAMINAÇÃO

Considerando que os agentes patogênicos de veiculação hídrica apresentam como ponto comum a sua eliminação pelas fezes dos indivíduos doentes ou portadores, uma alternativa para a avaliação da qualidade microbiológica da água é a pesquisa de organismos indicadores de poluição de origem fecal. Esses organismos, quando presentes na água indicam a ocorrência de poluição de origem fecal, evidenciando o risco da presença de organismos patogênicos.

São os seguintes os requisitos para a escolha de um microrganismo como indicador de contaminação fecal:

- a) ser um microrganismo ou um grupo de microrganismos prevalente em esgotos e excretado pelo homem ou outros animais homeotérmicos.
- b) sua densidade deve ter uma relação direta com o grau de contaminação fecal.
- c) deve ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático ou pelo menos não mais que as bactérias entéricas.
- d) deve apresentar maior resistência aos desinfetantes que os microrganismos patogênicos (embora não extremamente resistente).
- e) deve ser quantificável por métodos rápidos e simples de laboratório.

5.1.1. Principais Indicadores - Bactérias do Grupo Coliforme

As bactérias do grupo coliformes são utilizadas como indicadores de poluição ou contaminação, pois:

- a) encontram-se normalmente no intestino do homem e de animais de sangue quente.
- b) existem nas fezes, na proporção de 300 milhões por grama de fezes (algumas bactérias do grupo também são encontradas no solo - Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella) e sobre os vegetais.
- c) devido à prevalência no esgoto do grupo coliforme, eles podem ser prontamente isolados na água poluída recentemente por matéria fecal. Conclui-se que se a água está poluída por matéria fecal, os agentes de doença que são transmitidos por via hídrica poderão também estar presentes nesta água.
- d) a ausência de coliformes é prova de uma água bacteriologicamente potável.

5.1.2. Definições

Os organismos coliformes são definidos como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose com produção de gás em 24-48 h a 35 °C. Neste grupo são incluídos os gêneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella.

A Organização Mundial da Saúde apresenta definição mais completa, segundo a qual são incluídos no grupo coliforme todos os bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície com propriedades similares de inibição de crescimento e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35 °C em 24-48 horas.

Uma percentagem elevadíssima dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais é de E. coli (cerca de 95%). Além de E. coli se encontrará sempre certo número de outras espécies, principalmente Enterobacter aerogenes. De estudos realizados ficou estabelecido que as fezes do homem e animais de sangue quente são riquíssimas em coliformes e que estas bactérias não existem em águas não poluídas, a não ser um número muito reduzido. Alguns membros do grupo coliforme podem ocorrer, às vezes, com relativa abundância no solo e mesmo em plantas, mas ainda assim as águas não poluídas praticamente não apresentam estas bactérias.

Outra grande vantagem dos coliformes como índice de poluição fecal é o fato bem estabelecido do seu número numa água apresentar, com o tempo, decréscimo praticamente igual ao das bactérias patogênicas intestinais. Os coliformes são facilmente isolados da água e identificados; as técnicas bacteriológicas para revelá-los são simples, além de rápidas e econômicas para serem aplicadas nos exames de rotina para avaliar a qualidade bacteriológica da água. Três métodos são aceitos para a análise bacteriológica da água:

- a) método dos Tubos Múltiplos (NMP) - quantitativo
- b) método da Membrana Filtrante (MF) - quantitativo
- c) Teste de Presença (P/A) - qualitativo

5.2. APLICAÇÃO DAS ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

A pesquisa das bactérias do grupo coliforme na água pode gerar informações aplicáveis a diferentes finalidades específicas. Essas análises podem ser empregadas em circunstâncias variáveis para julgamento de aspectos muito diversos, como os seguintes:

a) determinação das características da água in natura, para:

- estabelecimento do tipo de tratamento a ser aplicado;
- aproveitamento para consumo, recreação, irrigação, etc.;
- classificação de um curso d'água quanto à possibilidade ou não de recepção de esgotos ou outros despejos.

b) medida da eficiência das Estações de Tratamento de Água:

- água in natura, decantada, filtrada e clorada.

c) controle de potabilidade da água no sistema de distribuição.

OBS.: Entre todas as análises da água (físico, químico e biológico) o exame bacteriológico é mais sensível e seus resultados indicam as condições da água no momento de sua coleta.

6. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁGUAS

6.1. INTRODUÇÃO

A caracterização das águas é uma tarefa complexa, envolvendo grande número de etapas, entre elas o plano de coleta de amostras do qual dependem todas as etapas subsequentes: análises laboratoriais, interpretação de dados, elaboração de relatórios e tomada de decisões quanto à qualidade da água.

Na seleção do ponto para a coleta das amostras, dois aspectos estão envolvidos: o local dentro do sistema (bacias hidrográficas, cursos de água, rios, lagos, reservatórios, estações de tratamento, sistemas de distribuição) e a posição exata do local escolhido.

Os locais selecionados para a coleta de amostras dependerão dos objetivos do estudo, por exemplo, o local de amostragem poderá ser o afluente e o efluente de uma unidade de estação de tratamento cuja eficiência se quer conhecer, ou um rio ou reservatório no local de captação para abastecimento de água potável como também podem ser realizadas coletas para se caracterizar o efeito de um efluente na qualidade de água de um rio ou ainda avaliar a qualidade da água potável fornecida a uma comunidade.

6.2. COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A coleta de amostras para análise microbiológica deve ser realizada sempre antes da coleta de qualquer outro tipo de análise, a fim de evitar o risco de contaminação do local de amostragem com frascos ou amostradores não estéreis.

Em hipótese alguma, amostras compostas devem ser coletadas para análises microbiológicas, pois não oferecem informações sobre as variações que podem ocorrer no fluxo e composição de efluentes lançados nos corpos de água; além disso, uma ou mais porções da amostra composta podem conter material tóxico ou nutritivo, determinando resultados que não são representativos da água em um dado momento.

6.2.1. Coleta em sistemas de distribuição de água para consumo humano

Antes da coleta da amostra é preciso verificar se o ponto de coleta recebe água diretamente do sistema de distribuição e não de caixas, reservatórios, cisternas, etc. A torneira não deve ter aeradores ou filtros, nem apresentar vazamento de água. Inicialmente, abre-se a torneira e deixa-se correr a água durante dois a três minutos, ou o tempo suficiente para eliminar impurezas e água acumulada na canalização.

Antes da coleta, a torneira pode ser flambada, se necessário, entretanto, esse procedimento não é aconselhável, pois além de provocar danos às torneiras e válvulas comprovou-se não possuir efeito letal sobre as bactérias. Caso seja necessário realizar a desinfecção da torneira, utiliza-se uma solução de hipoclorito para eliminar qualquer tipo de contaminação externa. Se esse tipo de desinfecção for utilizado, deve-se remover completamente o hipoclorito antes da coleta. Abre-se a torneira à meia secção, para que o fluxo seja pequeno e não haja respingos, deixando-se a água escoar durante aproximadamente um a dois minutos. Remove-se a tampa do frasco conjuntamente com o papel protetor, com todos os cuidados de assepsia, tomando precauções para evitar a contaminação da amostra pelos dedos, luvas ou outro material. Segura-se o frasco verticalmente, próximo à base e efetua-se o enchimento, deixando um espaço vazio de aproximadamente 2,5 a 5,0 cm do topo, o que possibilita a homogeneização correta da amostra antes de iniciar a análise. Fecha-se o frasco imediatamente após a coleta, fixando bem o papel protetor ao redor do seu gargalo e identifica-se adequadamente a amostra no frasco e na ficha de coleta.

6.2.1.1. Número de Análises Necessárias

O número de análises necessárias depende:

- das fontes de abastecimento;
- da eficiência do tratamento;
- do número de consumidores;
- da capacidade do laboratório (instalação e pessoal), etc.

A frequência mínima de exames para a pesquisa de coliformes segundo a Portaria nº 36, de 19.01.90 - Ministério da Saúde, para avaliação da qualidade bacteriológica das águas destinadas ao consumo humano.

6.2.1.2. Agente Neutralizador de cloro residual:

Para a coleta de amostras de água tratada deve-se adicionar ao frasco da coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente, ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, apenas previne a ação bactericida do cobre.

6.2.1.3. Agentes quelantes

Para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volume de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente, ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, apenas previne a ação bactericida do cobre.

6.2.1.4. Identificação da amostra

A amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a amostra devem ser completas (número da amostra, data, local, pH, temperatura e outros dados necessários para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.2.1.5. Transporte e conservação da amostra

Após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível.

O tempo máximo ideal entre a amostragem e o início do exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10 °C) e conservadas assim até o início do exame.

6.2.2. Coleta em poços freáticos

Em poços equipados com bombas manuais ou mecânicas, bombeia-se a água durante aproximadamente cinco minutos e realiza-se a desinfecção da saída da bomba, deixando a água escorrer novamente antes da coleta das amostras. Em poços sem bomba, a amostragem deverá ser feita diretamente no poço utilizando-se um recipiente esterilizado, porém não se retiram amostras da camada superficial da água, evitando a contaminação com a espuma ou com o material das paredes do poço.

6.2.3. Coleta em águas superficiais (rios, lagos, etc.)

Quando as amostras forem coletadas diretamente de um corpo d'água receptor, procura-se selecionar pontos de amostragem bem representativos da amostra de água a ser examinada, evitando-se a coleta de amostras em áreas estagnadas ou em locais próximos à margem. A coleta em águas superficiais pode ser feita manualmente ou através de equipamento adequado.

6.2.3.1. Coleta manual

Com todos os cuidados de assepsia, remover a tampa do frasco juntamente com o papel protetor. Com uma das mãos segurar o frasco pela base, mergulhando-o rapidamente com a boca para baixo, a cerca de 15 a 30 cm abaixo da superfície da água, para evitar a introdução de contaminantes superficiais. Direcionar o frasco de modo que a boca fique em sentido contrário à corrente (figura 1).

Deverá ser criada uma corrente artificial, através da movimentação do frasco na direção horizontal (sempre para a frente). Inclinar o frasco lentamente para cima para permitir a saída do ar e consequente enchimento do mesmo. Após a retirada do frasco do corpo de água, desprezar uma pequena porção da amostra, deixando um espaço vazio que permita uma boa homogeneização da amostra antes do início da análise. Fechar o frasco imediatamente, fixando o papel protetor ao redor do gargalo e identificar adequadamente a amostra no frasco e na ficha de coleta.

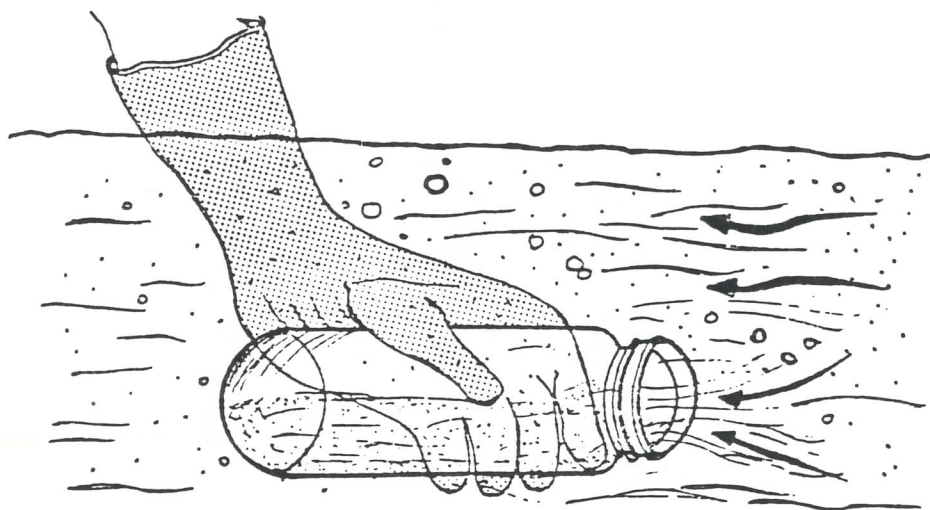


FIGURA 1 - Coleta Manual (Águas Superficiais)

6.2.3.2. Coleta com auxílio de equipamentos

Nos casos em que a localização do ponto de amostragem impossibilite a coleta diretamente no local, será necessária a utilização de dispositivos adequados para essa finalidade, devendo a mesma ser efetuada a partir de pontes, barrancos e outros locais de acesso.

Um desses dispositivos é apresentado na Figura 2, consistindo numa estrutura metálica para conter o frasco com segurança. Para a coleta da amostra, colocar, com todos os cuidados de assepsia, o frasco na estrutura de metal, remover sua tampa com o papel protetor e descer o conjunto no corpo de água, por meio de um cordel preso à estrutura metálica. Esse cordel deve ser preferencialmente de náilon, material que não absorve água e nem apodrece facilmente. Por meio de movimentos do cordel, voltar a boca do frasco contra a correnteza, numa profundidade de 15 a 30 cm abaixo da superfície da água. Após o enchimento do frasco, puxar rapidamente o cordel, retirar o frasco da estrutura metálica e proceder como descrito anteriormente. Tomar cuidado para que não haja deslocamento de sujeiras ou outros materiais da plataforma de amostragem para o corpo de água.

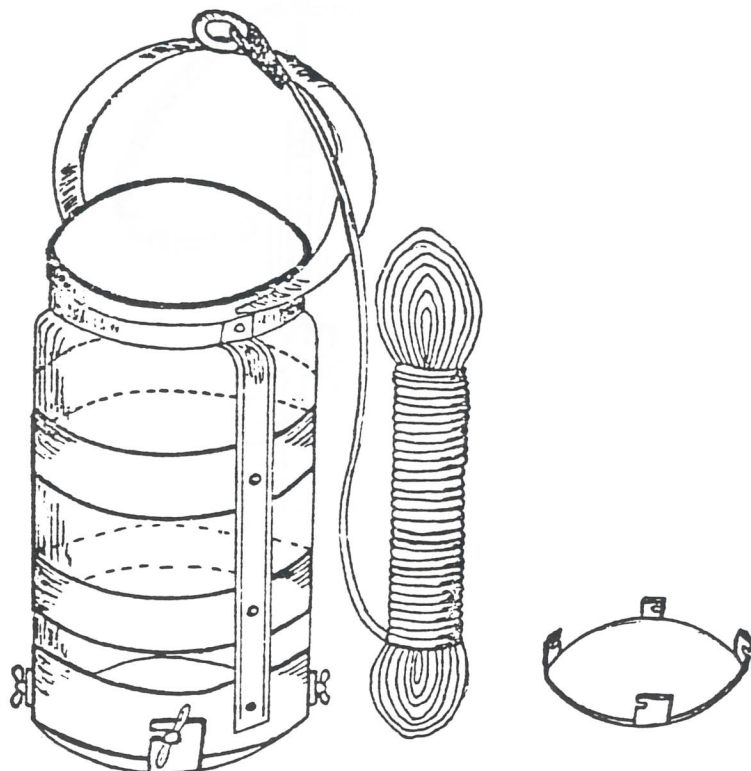


FIGURA 2 - Estrutura de metal para amostragem

6.2.3.3. Coleta em profundidade

Para coletas de amostras de profundidade em corpos de água, podem-se usar vários tipos de equipamentos (amostrador de Niskin, garrafa de Meyer, Van Dorn).

A seguir serão descritos os tipos de amostradores mais utilizados (Zobell J-Z e Kemmerer).

a) Amostrador de Zobell J-Z (Figura 3)

Trata-se de um equipamento que evita a contaminação da amostra quando da descida do mesmo no corpo de água, porque só se abre na profundidade desejada. É indispensável quando se deseja obter um alto grau de assepsia.

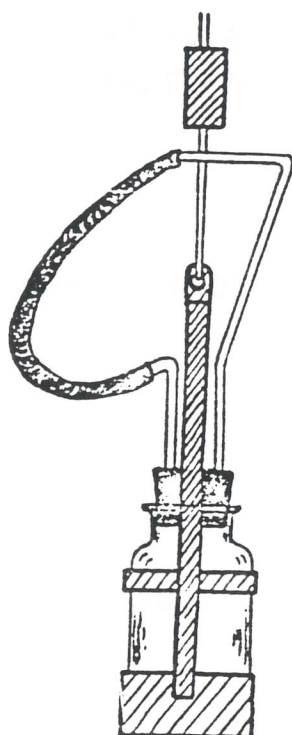


FIGURA 3 - Amostrador de Zobell J-Z

b) Amostrador de Kemmerer (Figura 4)

É o mais conhecido e tem sido utilizado principalmente para coleta de amostras estratificadas, em áreas poluídas, coletando-se inicialmente as amostras com menor grau de poluição. A sua característica é descer com o cilindro de coleta aberto, fechando-se na profundidade desejada. A contaminação de uma amostra para outra pode ser reduzida pela lavagem do equipamento com o próprio líquido a ser amostrado.

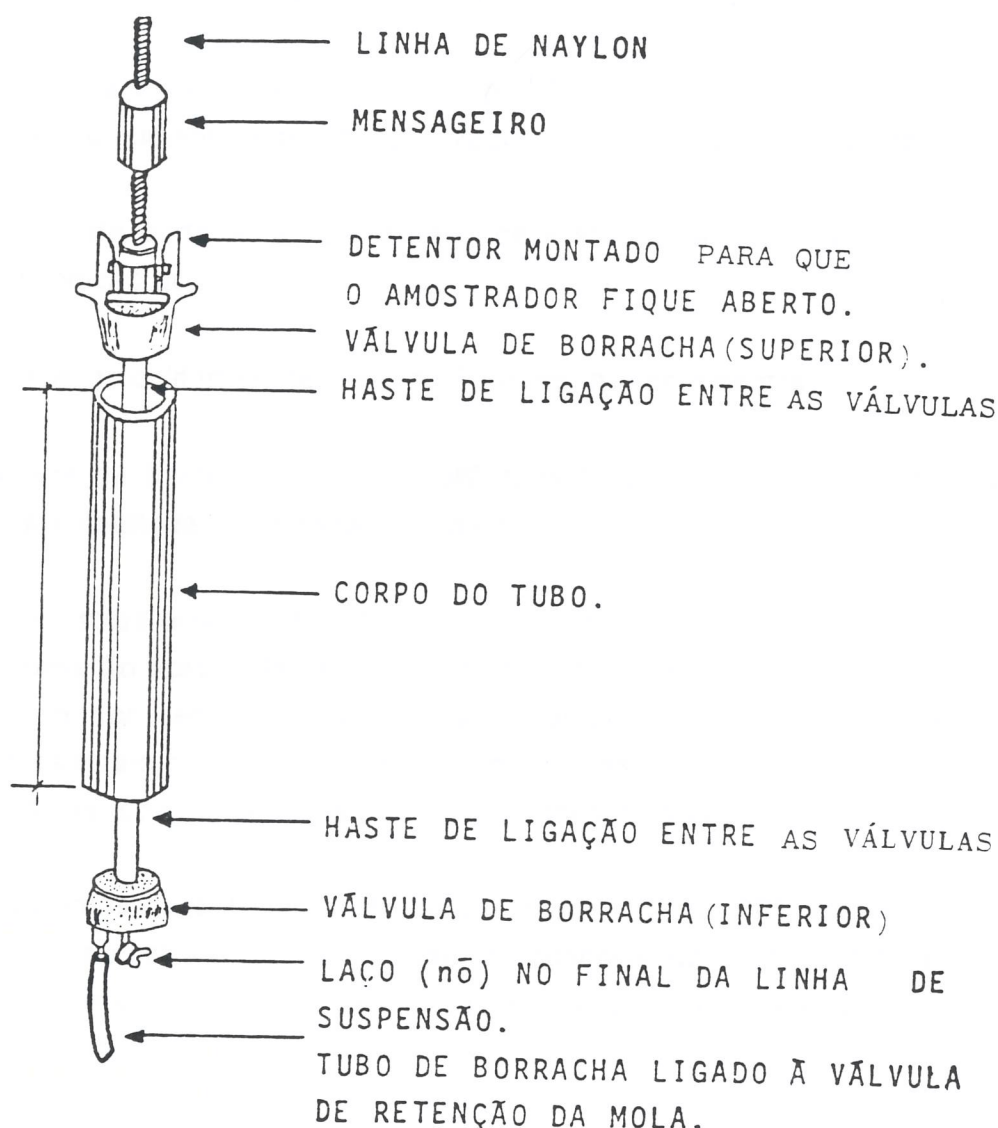


FIGURA 4 - Amostrador de Kemmerer

PADRÕES BACTERIOLÓGICOS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Os padrões que determinam a qualidade da água variam conforme as condições de cada país, e, dentro de um mesmo país, as autoridades competentes modificam os padrões e parâmetros conforme as condições regionais.

Legislação Federal e Estadual

PORTARIA Nº 36, DE 19/01/90 - MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL

Esta portaria estabelece normas e o padrão de potabilidade de água destinada ao consumo humano, a serem observados em todo o território nacional.

Segundo esta portaria, a água potável deve atender às seguintes características bacteriológicas de qualidade:

- Ausência de coliformes fecais em 100 (cem) mL de amostra.
- Ausência de bactéria do grupo coliformes totais em 100 (cem) mL quando a amostra é coletada na entrada da rede de distribuição.
- Nas amostras procedentes da rede de distribuição, 95% (noventa e cinco por cento) deverão apresentar ausência de coliformes totais em 100 (cem) mL. Nos 5% (cinco por cento) das amostras restantes, serão tolerados até 3 (três) coliformes totais em 100 (cem) mL, desde que isso não ocorra em duas amostras consecutivas, coletadas sucessivamente no mesmo ponto.
- Nos sistemas de distribuição de água sem tratamento, 98% (noventa e oito por cento) das amostras deverão apresentar ausência de coliformes totais em 100 (cem) mL. Nos 2% (dois por cento) das amostras restantes serão tolerados até (três) coliformes em 100 (cem) mL, desde que isso não ocorra em duas amostras consecutivas, coletadas sucessivamente no mesmo ponto.

- Em água não canalizada usada comunitariamente e sem tratamento (poços, fontes, nascentes etc ...), desde que não haja disponibilidade de água de melhor qualidade, 95% (noventa e cinco por cento) das amostras devem apresentar ausência de coliformes totais em 100 (cem) mL. Nos 5% (cinco por cento) as amostras restantes serão tolerados até 10 (dez) coliformes totais em 100 (cem) mL, desde que isso não ocorra em duas amostras consecutivas, coletadas sucessivamente no mesmo ponto.

Neste caso, deve-se providenciar a melhoria dessa condição ou a utilização de água que apresente melhor qualidade bacteriológica, acompanhada por inspeções sanitárias freqüentes e coleta de dados epidemiológicos.

- O volume mínimo de amostra a ser analisado é de 100 mL. No caso da técnica dos tubos múltiplos, quando não houver possibilidade de analisar os 100 mL, permite-se a análise de 5 porções de 10 mL (50 mL).

- Quando forem obtidos resultados desfavoráveis, pelo teste P/A (presença/ausência), duas novas amostras deverão ser coletadas nos mesmos pontos, em dias imediatamente consecutivos, para exame quantitativo, quer pela técnica de tubos múltiplos ou de membrana filtrante, visando a atender os itens anteriores no referente à percentagem de amostras onde se considera o limite máximo tolerado de coliformes totais.

- Em qualquer dos casos especificados nos itens anteriores, que apresentem resultados desfavoráveis, novas amostras deverão ser coletadas nos mesmos pontos em dias imediatamente sucessivos, até que duas amostras consecutivas revelem qualidade satisfatória, em função das providências adotadas. Essas amostras, consideradas extras, não serão computadas no número mínimo de amostras estabelecido na tabela da página 36 (Número mínimo de amostras e freqüência mínima de amostragem, para verificação das características bacteriológicas da água do sistema de abastecimento público).

- Para efeito desta Portaria, na determinação de coliformes totais pelas técnicas dos tubos múltiplos e P/A, quando o ensaio presuntivo for positivo, a análise deverá ser conduzida até o ensaio confirmatório.

- Se ocorrer positividade das amostras analisadas pelos órgãos responsáveis pela vigilância da qualidade da água, o Serviço de Abastecimento de água deverá ser notificado para adoção das medidas corretivas e execução de novas análises, até que 2 (duas) amostras sucessivas apresentem resultados satisfatórios, após o que informará aos órgãos responsáveis pela vigilância, que poderão coletar novas amostras, para a confirmação da efetividade das medidas.

Recomendações

Para avaliar as condições sanitárias dos sistemas de abastecimento público de água, é recomendado que, em 20% (vinte por cento) das amostras analisadas por mês, semestre ou ano, seja efetuada a contagem de bactérias heterotróficas, que não poderão exceder a 500 (quinhentas) Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL. Se ocorrer número superior ao recomendado, deverá ser providenciada imediata coleta e inspeção local. Confirmada e/ou constatada irregularidade, deverão ser tomadas providências para sua correção. A técnica do espalhamento em placa ("Spread Plate Method") também poderá ser adotada. Na coleta, para verificação da colimetria positiva, recomenda-se que sejam coletadas 3 (três) amostras simultâneas, no local de amostragem e em 2 (dois) pontos situados antes e depois do mesmo.

Amostragem

O número mínimo de amostras e a frequência mínima de amostragem a serem efetuadas pelos serviços de abastecimento público deverão seguir a tabela abaixo:

NÚMERO MÍNIMO DE AMOSTRAS E FREQUÊNCIA MÍNIMA DE AMOSTRAGEM, PARA CADA VERIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS DA ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO

NÚMERO MÍNIMO DE AMOSTRAS A SEREM EFETUADAS PELO SERVIÇO DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DE ÁGUA

POPULAÇÃO TOTAL ABASTECIDA	FREQÜÊNCIA	AMOSTRAS MENSAIS
Até 5.000	Semanal	5
5.001 a 20.000	Semanal	1 p/cada 1.000 (hab)
20.001 a 100.000	2 x p/semana	1 p/cada 1.000 (hab)
Acima de 100.000	Diária	90 + (1 p/cada 10.000 hab)

Obs.: As amostras devem ser representativas da rede de distribuição, independente de quantas unidades de produção a alimentem, distribuídas uniformemente ao longo do mês.