



COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES EM EFLUENTE LÍQUIDO VISANDO REDUZIR INTERFERÊNCIAS EM LEITURA VISUAL POR FLUORESCÊNCIA

Liana Ruwer ⁽¹⁾

Formada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Maria. Responsável pelo Laboratório de Microbiologia de Águas e Efluentes do Laboratório de Controle de Qualidade da Companhia Águas de Joinville.

Giulia Graciella dos Santos Alves Alberti ⁽²⁾

Engenheira Química pela Universidade da Região de Joinville (Univille). Pós Graduanda em Engenharia da Qualidade com Ênfase em Processos pela UniSociosc. Responsável pelo Laboratório Físico-Químico de Água e Gestão Técnica do Laboratório de Controle de Qualidade da Companhia Águas de Joinville.

Isabel Kasemodel ⁽³⁾

Engenheira Química pela Universidade da Região de Joinville (Univille). Gestora da Qualidade do Laboratório de Controle de Qualidade-Efluentes- da Companhia Águas de Joinville.

Endereço ⁽¹⁾: Rodovia SC 418, km 3,5 (Antiga SC 301)– Distrito de Pirabeiraba – Joinville – Santa Catarina – CEP 89224-055 – Brasil - Tel: +55 (47) 3481 1408 - e-mail: giulia.alberti123@gmail.com.

RESUMO

O presente trabalho surgiu da necessidade de solucionar dificuldades analíticas detectadas na rotina de microbiologia do Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) da Companhia Águas de Joinville. O LCQ analisa amostras de diferentes matrizes ambientais, operando em suporte operacional às Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), monitorando a qualidade dos mananciais de captação e dos corpos receptores da cidade de Joinville/SC. Desde que foi implantado, o Laboratório de Microbiologia de Efluentes adotou o método para determinação de Coliformes Totais e *Escherichia coli* por substrato cromogênico enzimático. Este método oferece como vantagens a facilidade operacional, leitura em 24 horas, possibilidade de quantificação de amostras extremamente contaminadas como é o caso dos efluentes domésticos, com o uso de diluições subsequentes. Porém tem como desvantagem ser um método que utiliza enzimas ligadas a marcadores cromogênicos que sofrem interferências bioquímicas pela natureza do analito e sua composição desconhecida. Estas interferências geram distorções na quantificação, falso positivo e impossibilidade de leitura em alguns casos. Este trabalho visa testar uma alternativa metodológica que possibilite quantificar mais precisamente as amostras que possuam interferência. A metodologia escolhida foi a membrana filtrante com meio de cultura seletivo e diferencial para os microrganismos alvo, o “Harlekin”.

PALAVRAS-CHAVE: Coliformes, Microbiologia de efluentes, substrato cromogênico.

INTRODUÇÃO:

O Laboratório de Microbiologia de Efluentes vinculado ao Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) tem como função apoiar o monitoramento do conjunto das Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) operadas pela Companhia Águas de Joinville, monitorar a qualidade dos mananciais de captação, dos corpos receptores e bacias hidrográficas do município de Joinville, estado de Santa Catarina. Na rotina são analisadas matrizes de diferentes origens com ampla variação de interferentes e de concentrações dos microrganismos alvo. Faz parte de seu escopo a determinação de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes (*Escherichia coli*). A metodologia de rotina utiliza substrato enzimático ONPG/MUG em cartela Quany-tray a qual fornece uma determinação semiquantitativa dos microrganismos alvo.

O método ONPG/MUG é composto de dois substratos colorimétrico-enzimáticos e conseqüentemente, duas fases de leitura e quantificação. A primeira é a quantificação de Coliformes totais pelo desenvolvimento de coloração amarela na presença da enzima Beta-Galactosidase que degrada o reagente ONPG. A segunda é a quantificação de *Escherichia coli*, um microrganismo pertencente ao grupo maior de Coliformes totais, que além de possuir a enzima comum ao grupo Coliformes, também tem como marcador outra enzima, a Beta-

Glucuronidase, que degrada o reagente MUG desenvolvendo fluorescência sob luz UV em 365nm. A contagem é feita no sistema de Cartelas Quanty-tray e os resultados são reportados para a Tabela de Distribuição de Poisson e transformados em NMP/100ml (Numero Mais Provável por 100 mililitros). Na rotina de análises há dificuldade na leitura por fluorescência para quantificação de *Escherichia coli* pelo método em uso. A visualização do resultado da análise é feita através da diferenciação de cor e fluorescência, sendo que principalmente para fluorescência existe forte interferência do analito, levando a falsos positivos e muitas vezes impossibilitando a contagem. Esta interferência é detectada principalmente na saída do tratamento (efluente tratado e clorado). Esta interferência observada pode ser oriunda de uma interação do reagente ONPG/MUG com algum composto químico ou microrganismo presente na amostra. Dentre as possibilidades consideram-se os derivados de Cloro (provenientes da etapa de desinfecção) ou presença em concentração desbalanceada de bactérias do tipo Filamentosas. Considerando que para microbiologia de efluentes, os métodos analíticos variam em especificidade, sensibilidade e capacidade de quantificação, é necessário avaliar e utilizar aquele que melhor se adapta a amostra analisada de forma a gerar resultados confiáveis.

OBJETIVO

Prospectar alternativa analítica que elimine ou reduza a dificuldade que o método em uso apresenta. Encontrar um método que possibilite quantificação em casos onde o método atual não consegue quantificar. Reduzir a quantificação “falsa positiva” ocasionada pela dificuldade na leitura das amostras com interferência de fluorescência. Possibilitar uma maior precisão em faixas onde o método NMP resulta em contagens extremas como $<1 E+xx$ ou $>2419,6 E+xx$ onde não há um valor numérico determinado. Testar outro método analítico que não sofra tais interferências e que ofereça uma quantificação mais precisa do microrganismo alvo, a *Escherichia coli*. Em microbiologia os métodos de contagem de colônias em placa são considerados método ouro e por este motivo são utilizados para validar outros métodos como enzimáticos, colorimétricos, imunológicos, etc. O próprio método em uso, por ONPG/MUG em cartela quanty-tray, foi criado originalmente para determinações qualitativas e mais tarde adaptado para quantitativo com validação por metodologia de contagem em placa de Petry.

METODOLOGIA

Utilizada a metodologia descrita pelo *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*, método 9223 B - Teste de substrato enzimático C; procedimento para multicélulas. Este método será comparado com o método de Membrana Filtrante em meio de cultura seletivo e diferencial duplamente cromógeno, descrito na mesma referência, método 9218 B - Método de Membrana Filtrante, 9222 J - Detecção Simultânea de Coliformes Totais e *Escherichia coli* por duplo cromógeno em Membrana Filtrante. O estudo utilizou amostras de rotina do Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ), oriundas de estações de tratamento de efluentes. O estudo ocorreu dentro da realidade do Laboratório de Efluentes, não descartando nem priorizando amostras. Os ensaios foram rodados nas duas metodologias em paralelo, no mesmo dia de entrada das amostras, durante 4 meses. Como o volume de amostra recebido é restrito a 250 mililitros (mL) e a análise necessita de no mínimo 100 mililitros (mL), salvo diluições, não foi possível rodar repetições. As réplicas rodadas são as mesmas já adotadas na rotina, priorizando amostras com diluição de 1:10 devido ao volume de amostra disponível.

O resultado do teste de Substrato Enzimático é semiquantitativo, ou seja, é expresso em NMP/100 mL (número mais provável em 100 mililitros). Já o método em teste será uma associação do método de concentração por Membrana Filtrante juntamente com o meio Harlequin. Esta associação permite colocar os microrganismos presentes em 100 mililitros de amostra pura ou diluída, em uma placa de petry para crescimento em um meio seletivo, diferencial cromogênico para quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli*. O meio selecionado foi Harlequin E. Coli/Coliform Medium, um meio duplamente cromógeno para enumeração simultânea de *Escherichia coli* e Coliformes. Este meio de cultura foi originalmente desenvolvido para matriz de água tratada, bruta ou alimentos. Os métodos baseados em cultura em placa inoculados diretamente com a amostra são considerados métodos de referência, pois são quantitativos e expressam o resultado em UFC (Unidade Formadora de Colônia). Isto significa que para cada unidade de bactéria presente na amostra inoculada teremos uma unidade formadora de colônia.

Antes de adotar um novo método analítico, um laboratório deve verificar o efeito do método em curso, preferencialmente contrastando o efeito com os dados de validação, sempre que estiverem disponíveis. Em



microbiologia a incerteza de medição utiliza como critério de precisão, o cálculo de reprodutibilidade e de condição de repetibilidade. Para métodos de contagem de colônias, devem ser calculados estes parâmetros para cada contagem, para usualmente praticar-se uma derivação dos valores individuais para a repetibilidade e reprodutibilidade, que posteriormente se aplicam a todas as contagens (ISO/TR 13843).

A precisão de resultados determinados mediante métodos de número mais provável (NMP), também varia em função do resultado, ainda em maior escala. Portanto, não resulta apropriado anunciar resultados de precisão geral (repetibilidade e reprodutibilidade) para métodos NMP e estes devem ser calculados os valores de repetibilidade e reprodutibilidade para cada valor NMP. O estudo executado por Idexx-2008 disponibilizou a tabela 1 de NMP para o sistema de poços Quanti-tray 51, junto com a repetibilidade teórica (cálculo estimado de precisão) para cada NMP como valores de incerteza relativa para cada NMP ($\log_{10}SD$, calculado a partir dos valores de intervalo de confiança de 95% de NMP) e a repetibilidade (incerteza padrão relativa) como coeficiente de variação (CV%). Como se pode comprovar, a gama de repetibilidade teórica oscila entre os 17,4% para um NMP de 39 a 40, e os 100,0%, para um NMP de 1. Por esta razão, não se pode realizar ensaios normais de avaliação de repetibilidade e reprodutibilidade (ou seja, àqueles ensaios aprovados pela ISO/TR 13843) sobre os métodos NMP e, portanto, se necessita adotar uma alternativa de aproximação, que foi considerada no presente trabalho.

Tabela 1- Intervalos de confiança de 95% e cálculos estimados da precisão teórica para cada valor NMP de Colilert®-18/Quanti-Tray® de 51 poços

No. de pocillos que muestran reacción positiva	NMP por cada muestra de 100 ml	Intervalos de confianza del 95%		Repetibilidad y reproductibilidad teóricas	
		Inferior	Superior	Log ₁₀ SD con desviación estándar	%CV con incertidumbre estándar relativa
0	<1.0	0.0	3.7	-	-
1	1.0	0.3	5.6	0.4343	100.0
2	2.0	0.6	7.3	0.3071	70.7
3	3.1	1.1	9.0	0.2508	57.7
4	4.2	1.7	10.7	0.2172	50.0
5	5.3	2.3	12.3	0.1943	44.7
6	6.4	3.0	13.9	0.1774	40.9
7	7.5	3.7	15.5	0.1643	37.8
8	8.7	4.5	17.1	0.1537	35.4
9	9.9	5.3	18.8	0.1450	33.4
10	11.1	6.1	20.5	0.1376	31.7
11	12.4	7.0	22.1	0.1313	30.2
12	13.7	7.9	23.9	0.1257	29.0
13	15.0	8.8	25.7	0.1209	27.8
14	16.4	9.8	27.5	0.1166	26.8
15	17.8	10.8	29.4	0.1127	26.0
16	19.2	11.9	31.3	0.1092	25.1
17	20.7	13.0	33.3	0.1061	24.4
18	22.2	14.1	35.2	0.1032	23.8
19	23.8	15.3	37.3	0.1005	23.1
20	25.4	16.5	39.4	0.0981	22.6
21	27.1	17.7	41.6	0.0959	22.1
22	28.8	19.0	43.9	0.0938	21.6
23	30.6	20.4	46.3	0.0919	21.2
24	32.4	21.8	48.7	0.0902	20.8
25	34.1	23.3	51.2	0.0885	20.4
26	36.4	24.7	53.9	0.0870	20.0
27	38.4	26.4	56.6	0.0856	19.7
28	40.6	28.0	59.5	0.0843	19.4
29	42.9	29.7	62.5	0.0830	19.1
30	45.3	31.5	65.6	0.0819	18.9
31	47.8	33.4	69.0	0.0809	18.6
32	50.4	35.4	72.5	0.0799	18.4



Tabela 1 (continuação) - Intervalos de confiança de 95% e cálculos estimados da precisão teórica para cada valor NMP de Colilert®-18/Quanti-Tray® de 51 poços

33	53.1	37.5	76.2	0.0791	18.2
34	56.0	39.7	80.1	0.0783	18.0
35	59.1	42.0	84.4	0.0776	17.9
36	62.4	44.6	88.8	0.0770	17.7
37	65.9	47.2	93.7	0.0765	17.6
38	69.7	50.0	99.0	0.0761	17.5
39	73.8	53.1	104.8	0.0758	17.4
40	78.2	56.4	111.2	0.0756	17.4
41	83.1	59.9	118.3	0.0756	17.4
42	88.5	63.9	126.2	0.0757	17.4
43	94.5	68.2	135.4	0.0761	17.5
44	101.3	73.1	146.0	0.0768	17.7
45	109.1	78.6	158.7	0.0778	17.9
46	118.4	85.0	174.5	0.0794	18.3
47	129.8	92.7	195.0	0.0819	18.9
48	144.5	102.3	224.1	0.0859	19.8
49	165.2	115.2	272.2	0.0929	21.4
50	200.5	135.8	387.6	0.1094	25.2
51	> 200.5	146.1	infinito	-	-

RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos são referentes a amostras de efluente tratado (após cloração) provenientes das Estações de Tratamento de Esgoto da Companhia Águas de Joinville dos bairros Espinheiros (EE6), Profipo (EP6) e Morro do Amaral (EM6). A ETE Espinheiros possui dois tanques de aeração e, portanto observam-se resultados provenientes de efluente tratado no tanque 1 (T1) e tanque 2 (T2).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos no período de estudo, as diluições utilizadas já foram contempladas nos valores tabelados. A observação “IF” representa a condição de interferência de fluorescência observada na leitura que acontece na leitura em cartelas *Quanti-tray*. Pode-se observar desenvolvimento de fluorescência mesmo em células onde não há desenvolvimento de cor amarela no primeiro estágio de leitura. Esta identificação por “IF” também foi utilizada quando observamos interferência azulada de fundo na Membrana Filtrante das mesmas amostras.

Na figura 3 temos um exemplo de leitura em cartela *Quanti-tray* na identificação de Coliformes Totais com desenvolvimento de coloração amarela para os poços considerados positivos. Observa-se que há poços com um leve tom amarelado, mas menos intenso que o padrão de leitura fornecido pelo fabricante. Estes são considerados negativos, mas aqui já se percebe uma interferência da coloração da amostra pura na leitura. Já nas células pequenas esta interferência é menos intensa. Pode-se observar que foram considerados como reagente as 34 células grandes e 4 células pequenas.

Na figura 1 temos um exemplo de leitura em segunda fase do método ONPG/MUG com leitura para *Escherichia coli* por desenvolvimento de fluorescência em 9 células grandes, nitidamente diferenciadas das demais. Esta cartela, na primeira fase de leitura apresentou uma conversão total de células grandes e pequenas com coloração amarela para Coliformes Totais. Neste exemplo temos uma excelente visualização na diferenciação dos microrganismos alvo.

Na figura 2 temos um exemplo de leitura na segunda fase. Aqui observamos uma forte interferência da amostra pura, com desenvolvimento de fluorescência na maior parte das células, tanto em células grandes como pequenas onde não havia desenvolvimento de cor amarela para Coliformes Totais. Neste caso temos a impossibilidade total de quantificação de *Escherichia coli*.

A figura 4 é o registro de uma leitura proveniente do método membrana filtrante de uma amostra pura que não ofereceu interferência para o método. Pode-se perfeitamente diferenciar os três padrões de colônias:

Colônias róseas e azuis são consideradas Coliformes Totais.

Colônias azuis são consideradas *Escherichia coli*.

Colônias incolores ou levemente amareladas são consideradas outros microrganismos que não pertencem ao grupo dos Coliformes.

Na figura 5 temos o método de membrana filtrante em meio seletivo e diferencial, com amostra de efluente oferecendo interferência na forma de coloração azulada de fundo. Aqui, apesar da grande quantidade de colônias filtradas e apesar da interferência sofrida, é possível realizar contagem e diferenciação entre colônias, róseas, colônias azuis e colônias incolores ou amareladas.

Como a leitura de ambos os métodos é visual e não utiliza equipamento analítico além de lupa e luz ultravioleta, fez-se a comparação entre os métodos através de registros fotográficos.



Figura 1 - Cartela quanti-tray leitura E.Coli sem interferência.



Figura 2 - Cartela quanti-tray leitura E.Coli com interferência.



Figura 3 - Cartela quanti-tray leitura de coliformes totais.

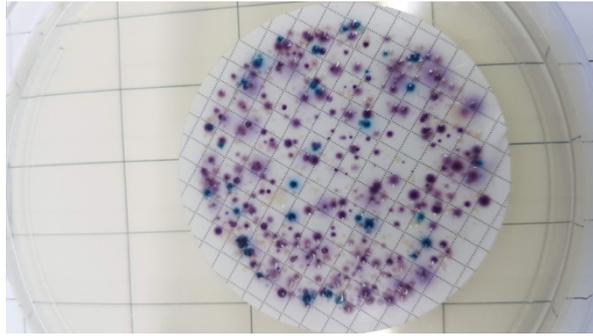


Figura 4 - Leitura em placa (membrana filtrante sem interferência)

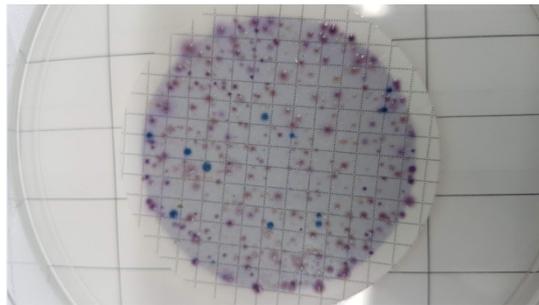


Figura 5 - Leitura em placa (membrana filtrante com interferência de fundo)

Tabela2: Resultados Obtidos.

Ponto	Diluição da MF	Volume MF/ml	<i>E. coli</i>		Observação
			Cartela	Membrana	
EM6	10	100	10	10	-
EM6	10	100	<1E+01	10	-
EE6 - T1	10	100	IF	10	IF
EE6 - T2	10	100	IF	0	IF
EE6 - T2	10	100	IF	10	IF
EE6 - T1	10	100	31	50	IF
EE6-T2	10	100	41	50	IF
EE6-T2	0	30	11	7	IF
EE6 - T1	0	30	IF	693	IF
EE6 - T2	10	100	20	140	IF
EE6	10	100	<1E+01	0	IF
EP6	0	100	<1E+00	0	-
EE6-T1	10	100	<1E+01	20	IF
EE6-T2	10	100	31	30	IF
EE6-T1	0	100	IF	20	IF
EE6-T1	10	100	20	20	IF
EM6	10	100	<1E+00	0	-
EE6-T2	0	100	10	6	IF
EE6-T1	0	100	<1E+00	0	IF
EE6-T1	10	100	<1E+01	0	IF
EE6-T2	0	100	>2419,6E+00	>2000E+01	IF
EE6-T2	10	100	>2419,6E+01	>2000E+01	IF
EE6-T2	0	100	<1E+00	0	IF
EE6-T2	10	100	<1E+01	0	IF

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Executada a avaliação dos resultados obtidos entre os dois métodos, considerando as limitações e interferências de cada um, foram analisados cada par de resultados em paralelo, Colilert *versus* Membrana Filtrante, quanto aos seguintes parâmetros:

1- Capacidade de quantificação, ou seja, fornecer valores numéricos absolutos (as leituras em valores aproximados como “> n” ou “< n” não podem ser considerados para fins de comparação em cálculos de repetibilidade). Nesta situação observamos vantagem do método em placa.

2- Distorções de leitura por Interferência na Fluorescência (leituras que sofreram Interferência de Fluorescência foram marcadas com “IF” e não podem ser consideradas para fins comparativos em cálculo de repetibilidade). Nesta situação temos vantagem de leitura pelo método em placa. Mesmo onde há interferência na placa, com formação de halo azulado ao fundo, este fator na maioria das vezes não impede a diferenciação das colônias.

3- Limite de Quantificação dos métodos em amostras com baixas contagens e com altas contagens. Aqui também temos vantagem no método em placa, pois é possível quantificar até 1 UFC/100ml . Já em cartela poderemos ter uma leitura de <1 NMP/100ml.

4- Repetibilidade obtida entre as leituras em valores absolutos comparável com a repetibilidade esperada para cada leitura possível pelo método NMP.

CONCLUSÃO

As amostras oriundas da ETE Espinheiros, ponto de amostragem do efluente tratado (EE6), na grande maioria das vezes, apresenta algum nível de interferência, seja pela própria coloração da amostra (amarelada) que interfere na primeira fase de leitura das cartelas, seja pela presença de interferentes químicos ou biológicos que causam uma falsa fluorescência na segunda fase da leitura. Nestas situações, há dificuldades na quantificação de Coliformes totais e de *Escherichia coli* pelo método em uso. Já o método em teste, membrana filtrante, possibilitou quantificação mais precisa destas amostras que tinham seus resultados distorcidos ou mesmo falsamente quantificados pelo método ONPG/MUG, mesmo quando observado interferência de fundo. Não foi possível realizar uma validação baseada num comparativo estatístico entre os critérios de precisão dos dois métodos, pelos motivos expostos acima.

Nos casos onde temos resultados >2419,6 NMP/100 ml para Cartela e > 2000 UFC/100ml para membrana filtrante, houve uma equivalência de resultados. Esta situação ocorre em amostras saturadas e em ambos os métodos é necessário fazer diluições até que se encontre uma faixa de microrganismos quantificável. Na prática, o histórico dos pontos é fundamental para se determinar em que faixa de resultados há probabilidade de se obter leitura. Aqui temos um inconveniente para o método em placa, pois amostras carregadas, com mais de 300 microrganismos em 100 ml de amostra filtrada, resultarão em dificuldades de contagem e resultados distorcidos. Neste caso, no experimento, optamos por sinalizar o resultado como >2000 UFC. Também podemos reduzir o volume de amostra filtrado para não saturar a membrana filtrante e depois corrigir o resultado por cálculo proporcional a 100 ml. Por isso na tabela 2 algumas amostras aparecem com um volume filtrado em membrana de 30 ml e o resultado já corrigido.

Na maioria dos casos onde houve interferência de fluorescência (IF) para leituras em Cartela, foi possível a leitura numérica em UFC/100 ml para o método membrana filtrante, o que representa uma quantificação mais confiável.

Nos casos onde temos resultados <1E+00 ou <1 E+01 NMP/100 ml em cartela, temos leituras que variam entre 0 e 10 UFC/100 ml para o método membrana filtrante.

Também temos situações em que a leitura da amostra diluída a 1:10 (10x) em cartela, nos dá um resultado <1E+01 (<10). Isto corresponde a dizer que o resultado pode ser qualquer valor menor que 10.

Analisando os resultados obtidos podemos concluir que o método testado em comparação ao método em uso pelo Laboratório de Controle de Qualidade, pode ser uma alternativa a ser implantada na rotina para analisar amostras em que há interferências pelo método ONPG/MUG em cartela Quanti-tray, gerando assim resultados mais precisos e confiáveis.

Para que um laboratório venha a utilizar os dados aqui gerados como critério de decisão sobre qual método utilizar, outros aspectos que aqui não foram pesquisados precisarão ser considerados, como:

-Custo de materiais (membrana filtrante, meio de cultura seletivo e diferencial, preparo e esterilização de meio de cultura, *manyfold* de inox, processo de esterilização de *manyfold* e suportes de membrana filtrante, placas de petry, produção de frascos de água de diluição, reagente substrato enzimático ONPG/MUG.

-Praticidade e tempo de análise entre os dois métodos.

-Nível mínimo de precisão que o ensaio deve atingir.

-Disponibilidade de volume de amostra.

-Qual o objetivo da análise (monitoramento de processo, fornecimento de laudo técnico...).

Na tomada de decisão, cada laboratório deve pesar suas dificuldades de análise, quais objetivos do ensaio em sua rotina e qual o nível de confiança que os resultados precisam oferecer. Só assim poderá definir a viabilidade de cada método em relação ao seu processo.

Esperamos ter contribuído com uma abertura de questionamentos quanto as reais limitações de ambos os métodos e oferecido luz sobre a realidade dos métodos analíticos microbiológicos em amostras de meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. *Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation*, 2008
2. IDEXX. *Validación del método Colilert®- 18/Quanti-Tray® para el recuento de E. coli y de bacterias coliformes en muestras de agua, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, EE. UU*, 2008
3. ISO/TR 13843. *Water Quality – Guidance on validation of microbiological methods*