

**CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO:
COMPARAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS**

Heterotrophic bacteria counting in the drinking water: comparison between two methodologies

*Vanessa Oliveira Domingues¹, Gilda Dias Tavares², Fernanda Stüker³, Tiago Mozzaquatro Michelot⁴,
Luiz Gustavo Brenner Reetz⁵, Claudia de Mello Bertonecheli⁵, Rosmari Hörner⁶.*

RESUMO

A contagem de bactérias heterotróficas é amplamente utilizada como indicador da qualidade da água potável, sendo que os microrganismos são detectados por propagação em meios não-seletivos. O objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias de "Pour Plate" e a semeadura por esgotamento para a contagem de bactérias heterotróficas em águas provenientes de poços artesianos e demais fontes alternativas da região de Santa Maria. Foram analisadas 43 amostras de água de poços artesianos e fontes alternativas, coletadas durante o período de 11 de julho a 10 de novembro de 2005. O método de semeadura por esgotamento revelou maior sensibilidade (58,2%) em relação ao "Pour Plate" (9,2%); houve compatibilidade do número de colônias em 32,6% das amostras avaliadas por ambas as técnicas. A partir dos dados obtidos foi possível observar o melhor desempenho da metodologia de semeadura por esgotamento.

Palavras-chave: Água potável. Análise da água. Qualidade da água.

SUMMARY

The counting of heterotrophic bacteria widely applied as an indicator of the quality of drinking water. In order to perform the counting, the microorganisms are detected by propagation in non-selective culture media. The objective of the present work was to compare the methodologies of "Pour Plate" and streaking on the surface of the plate for the counting of heterotrophic bacteria in water. The water samples were collected from July 11 to November 10, 2005, from 43 artesian wells and alternative sources of the Santa Maria region. The analyses results showed that the sowing for exhaustion presented a higher sensitivity (58.2%) as compared to the "Pour Plate" method (9.2%). There was colony number compatibility in 32.6% of the samples analyzed by both techniques. The results suggest a better performance for streaking on the surface as compared to the "Pour Plate" method.

Keywords: Drinking water. Water analysis. Water quality.

INTRODUÇÃO

A qualidade da água tornou-se uma questão de saúde pública no final do século XIX e início do século XX, devido à compreensão da relação água contaminada e doença¹. As doenças de veiculação hídrica são caracterizadas principalmente pela ingestão de água contaminada por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos basicamente pela rota fecal-oral^{2,3,4,5,6,7,8}. Segundo dados da Organização mundial da Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem em

países em desenvolvimento são ocasionados pela contaminação da água⁹.

No Brasil, o controle da qualidade da água para consumo humano tornou-se uma questão de saúde pública a partir da década de 70 com o decreto federal nº 79.367 de 09/03/1977, que estabelecia como competência do Ministério da Saúde (MS) a definição do padrão de potabilidade da água para consumo humano. As normas e o padrão de

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia (LAB) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

1- Acadêmica do Curso de Farmácia da UFSM – Bolsista PIBIC / CNPq – UFSM.

2- Professora adjunta do Departamento de Saúde da Comunidade (atualmente aposentada).

3- Acadêmica do curso dos Cursos de Farmácia e de Biologia da UFSM – Bolsista FIEIX – UFSM.

4- Farmacêutico bioquímico.

5- Farmacêuticos bioquímicos/ mestrandos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

6- Professora Adjunta da disciplina de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

potabilidade da água foram instituídos pela portaria nº 56/Bsb/1977, que se constituiu na primeira legislação federal sobre a potabilidade de água para consumo humano editada pelo MS^{1,10}. Atualmente está em vigor a portaria nº 518/2004, a qual estabelece a determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes (*E.coli*) e a contagem de bactérias heterotróficas para verificar a qualidade da água para consumo humano, sendo que a contagem padrão de bactérias heterotróficas não deve exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL)^{10,11,12,14}.

A contagem de bactérias heterotróficas, genericamente definidas como microrganismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da água de uma forma ampla. O teste inclui a detecção, inespecífica, de bactérias ou esporos de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da flora natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição. Servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre eventuais falhas na desinfecção, colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição^{9,14}.

As técnicas adotadas pela portaria nº 518/2004 para quantificar os coliformes e heterótrofos na água visam atender as especificações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, publicação da American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation^{11,12,14}.

As duas metodologias mais utilizadas para contagem de bactérias em placa são: o método de esgotamento em placa e o método “*Pour Plate*”^{8,11,12,13,14}. Pela metodologia de “*Pour Plate*” verte-se o meio fundido e estabilizado em banho Maria sobre a amostra, o que permite o crescimento bacteriano no interior do ágar. Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, uma vez que alguns microrganismos sensíveis ao calor podem ser danificados pelo ágar fundido resultando em um número inferior de colônias do que o verdadeiro. Devido a essa desvantagem o método do esgotamento é utilizado, onde a amostra é depositada na superfície do ágar já solidificado e, a seguir, uniformemente espalhada^{8,12,13,14}.

O objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias de “*Pour Plate*” e por esgotamento para a contagem de bactérias heterotróficas em águas provenientes de poços artesianos e demais fontes alternativas da região de Santa Maria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 43 amostras de água de poços artesianos e demais fontes alternativas (águas hospitalares, poços rasos, fontes naturais canalizadas, vertentes e caixa d'água), no período

compreendido entre 11 de julho a 10 de novembro de 2005, provenientes da cidade de Santa Maria e região. As amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis, utilizando álcool 70% para a assepsia das torneiras anteriormente à realização da coleta, e conservadas à temperatura de 4 a 8°C pelo tempo máximo de quatro horas, até o momento da sementeira. As amostras foram semeadas em triplicata nos meios de cultura *Plate Count Agar* (PCA) e *Tryptone Soy Agar* (TSA), sendo utilizado 1,0 mL das amostras de água para a sementeira pelo método de “*Pour Plate*” e 0,1 mL para sementeira por esgotamento. Após este procedimento as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, por 24/48h a 35°C ± 2°C. Para a metodologia de “*Pour Plate*” o meio de cultura até o momento da sementeira era mantido em banho-maria a 44-46°C, para impedir sua solidificação, e posteriormente vertido sobre as amostras, quando então era homogeneizado através de movimentos circulares suaves da placa, no sentido horário. Após o período de 48 horas de incubação, as colônias eram contadas, sendo que para a metodologia de esgotamento, o número encontrado era multiplicado pelo fator da diluição (10x), e o resultado das duas metodologias expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

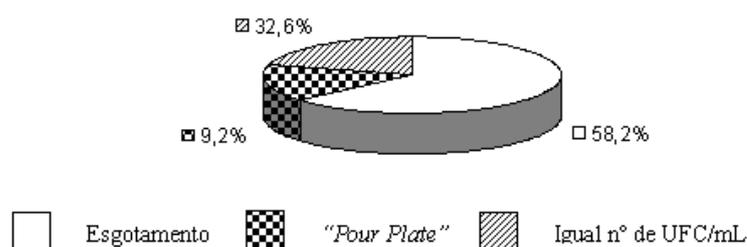
A procedência das 43 amostras de água analisada neste estudo esta representada na Tabela 1, onde o maior número de amostras (22; 51,2%) eram provenientes de caixa d'água.

Tabela 1 – Procedência das amostras de água utilizadas no estudo.

Fonte	n (%)
Água hospitalar	3 (7,0)
Água de poço artesiano	3 (7,0)
Fonte natural (vertente)	4 (9,3)
Água de poço raso	11 (25,5)
Caixa d'água	22 (51,2)
TOTAL	43 (100)

Das 43 amostras analisadas, 25 (58,2%) apresentaram maior número de UFC/mL pela técnica de sementeira por esgotamento, e apenas 4 (9,2%) obtiveram maior número de UFC/mL pela metodologia de “*Pour Plate*”, houve compatibilidade de resultados em 14 (32,6%), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Relação entre o maior número de colônias contadas conforme a técnica utilizada.



Com base nos resultados obtidos observamos que a metodologia de "Pour Plate" teve menor sensibilidade, por apresentar um menor número de UFC/mL em relação a técnica de semeadura por esgotamento perante uma mesma amostra de água. Este fato pode ser justificado porque a metodologia de "Pour Plate" apresenta algumas desvantagens, uma vez que alguns microrganismos sensíveis a temperatura de 44-46°C podem ter seu crescimento reduzido e ficarem impossibilitados de formar colônias⁸.

A contagem de bactérias heterotróficas é amplamente utilizada como indicador da qualidade da água para consumo humano. A contagem destes microrganismos é geralmente realizada em placas contendo meios não seletivos ricos em nutrientes que permitam a multiplicação de uma ampla faixa de microrganismos¹⁵.

Comparando os meios não-seletivos de TSA e PCA para a contagem de bactérias heterotróficas (Tabela 2) pela técnica de "Pour Plate", houve uma compatibilidade de resultados em 16 (38,1%) amostras analisadas e maior número de UFC/mL no meio de TSA com 17 (40,5%) amostras, sendo que uma amostra teve que ser desconsiderada por essa metodologia devido o meio de TSA ter contaminado. Pela técnica de semeadura por esgotamento, houve compatibilidade de resultados entre os dois meios em 18 (41,9%) amostras; todavia, o maior número de UFC/mL foi observado no meio de PCA com 14 (32,5%) amostras, enquanto no meio de TSA apenas 11 (25,6%) amostras resultaram em maior número de UFC/mL.

Tabela 2 – Comparação dos meios de cultura TSA e PCA em relação ao maior número de UFC/mL encontrada e a metodologia utilizada.

	"Pour Plate" n (%)	Esgotamento n(%)
TSA	17 (40,5)	11 (25,6)
PCA	9 (21,4)	14 (32,5)
Compatibilidade de resultados	16 (38,1)	18 (41,9)
TOTAL	42 (100)*	43 (100)

*Em uma amostra houve contaminação da placa de TSA.

A importância da determinação da densidade de bactérias tem em vista que um aumento na população bacteriana pode comprometer a detecção de bactérias do grupo coliformes. Apesar da maioria das bactérias heterotróficas não ser patogênica, pode representar riscos a saúde, como também deteriorar a qualidade da água, provocando o aparecimento de odores e sabores desagradáveis¹². A portaria n°518 de 2004 do Ministério da Saúde determina a contagem mensal de bactérias heterotróficas em sistemas de distribuição e limita a contagem destas em 500 UFC/mL¹¹. O número de UFC/mL obtidos utilizando as duas metodologias deste estudo esta representada na Tabela 3, onde se

observa que das 43 amostras analisadas 23 (53,5%) resultaram em mais de 500 UFC/mL. Pela semeadura por esgotamento observou-se um maior número de amostras com o limite de UFC/mL acima do permitido pela portaria do Ministério da Saúde, a metodologia de "Pour Plate" detectou apenas 13 amostras com mais de 500 UFC/mL.

A metodologia de semeadura por esgotamento detectou 10 amostras com mais de 500 UFC/mL não detectada pela metodologia de "Pour Plate", sendo que houve compatibilidade de resultados em 13 amostras, ou seja, as 13 amostras detectadas pela metodologia de "Pour Plate" também

foram detectadas pela metodologia de semeadura por esgotamento. Estes resultados demonstram a baixa sensibilidade da

metodologia de “*Pour Plate*” para contagem de bactérias heterotróficas.

Tabela 3 – Determinação de bactérias heterotróficas em UFC/mL.

Metodologia UFC/mL	“ <i>Pour Plate</i> ”	Esgotamento
	n (%)	n (%)
< 500	30 (69,8)	20 (46,5)
>500	13 (30,2)	23 (53,5)
total	43 (100)	43 (100)

A procedência das 23 amostras com mais de 500 UFC/mL está representada na tabela 4.

Tabela 4 – Procedência das amostras com mais de 500 UFC/mL.

Fonte	n (%)
Fonte Natural (Vertente)	2 (8,7)
Poço artesiano	2 (8,7)
Poço raso	9 (39,1)
Caixa d’água	10 (43,5)
Total	23 (100)

Das 22 amostras provenientes de caixa d’água em 10 (43,5%) detectou-se mais de 500 UFC/mL, este resultado pode ser explicado pela falta de informação da população em relação a manutenção, limpeza e higienização dos reservatórios de água⁵.

A contagem de bactérias heterotróficas em poços rasos depende das condições do poço como: profundidade, tipo de captação, distância entre o poço e a fossa sanitária, entre outros. Das 11 amostras de poços rasos, 9 evidenciaram mais de 500 UFC/mL. Silva *et al* (2003) analisando a qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas em Feira de Santana, na Bahia, observaram também um resultado expressivo de amostras com mais de 500 UFC/mL. Das 119 amostras analisadas naquele estudo, 85 (71,4%) obtiveram mais de 500 UFC/mL.

CONCLUSÃO

O elevado percentual de amostras com UFC/mL acima do limite permitido pela portaria do Ministério da Saúde é preocupante, pois favorecem o aparecimento de doenças de veiculação hídrica que atingem, principalmente, crianças e idosos. Assim, a utilização de metodologias de boa sensibilidade e fácil execução são necessárias para a análise da potabilidade da água para consumo humano. Com os resultados obtidos neste estudo observamos que a metodologia de semeadura por esgotamento apresentou melhor desempenho que a metodologia de “*Pour Plate*” para a contagem de bactérias heterotróficas. Este dado é preocupante, pois o “*Pour Plate*” é a metodologia padrão

recomendada. A menor eficácia da técnica de “*Pour Plate*” pode ser justificada pelo fato de que o meio de cultura necessita ser adicionado ainda quente (44-46° C) à amostra de água, e isto pode afetar a viabilidade das enterobactérias pesquisadas nas culturas de potabilidade da água, com exceção da *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são resistentes a estas temperaturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Freitas, M.B.; Freitas, C.M. A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 2005; 10(4): 993-1004.
- Amaral, L.A.; Nader Filho, A.; Rossi Junior, O.D.; Ferreira, L.A.; Barros, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev. Saúde Pública* 2003; 37(4): 510-514.
- d’Águila, P.S.; Roque, O.C.C.; Miranda, C.A.S.; Ferreira, A.P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Caderno de Saúde Pública* 2000; 16(3): 791-798.
- Bertagnolli, S.M.M.; Medeiros, J.T.; Tavares, G.M.D.; Limberger, J.B.; Traesel, A.C. Estudo de coliformes totais de fontes alternativas de água da zona rural da região centro do estado do Rio Grande do Sul. *Saúde* 2003; 29(1): 97-102.
- Silva, R.C.A.; Araújo, T.M. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). *Ciência & Saúde Coletiva* 2003; 8(4): 1019-1028.
- Freitas, M.B.; Brilhante, O.M.; Almeida, L.M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Caderno Saúde Pública* 2001; 17(3): 651-660.
- Libânio, P.A.C.; Chernicharo, C.A.L.; Nascimento, N.O. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. *Eng. Sanit. Ambient.* 2005; 10(3):219-228.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. *Microbiologia*. 8ª Edição, Editora Artmed, 2005.

9. Guerra, N.M.M.; Otenio, M.H.; Silva, M.E.Z.; Guilhermetti, M.; Nakamura, C.V.; Nakamura, T.U.; Dias Filho, B.P. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. Acta Sci. Biol. Sci. 2006; 28(1): 13-18.
10. Ministério da Saúde (MS), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM), Vigilância da qualidade de água para consumo humano (Vigiagua). Relatório das atividades vigiagua 1998 a 2005. 2005.
11. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de Março de 2004. Normas e padrão da potabilidade da água destinada ao consumo humano. Brasília (DF); 2004;
12. Fundação Nacional da Saúde (Funasa) Ministério da Saúde. Manual prático de análise de água. 1ª Edição, Brasília 2004.
13. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18° th ed. New York, 1992.
14. Ministério da Saúde. Comentários sobre a portaria MS Nº 518/2004: subsídios para implementação. 2005.
15. WHO – World Health Organization, 1993 (apud Guerra, N. M. M.), Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. Acta Sci. Biol. Sci. 2006; 28(1): 13-18.

Correspondência para:
Rosmari Hörner
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria RS – CEP: 97110-970
Telefone: (55)-220-8464
e-mail: rosmari@smaail.ufsm.br