SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL DO PARANÁ CURSO TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELLE CRISTINE HALUCH

PROPOSTA DE EMPRESA PRESTADORA DE SERVIÇOS DE ANÁLISES AMBIENTAIS

Análise microbiológica de amostras de água coletadas do oceano próximo a saída de esgoto no litoral da cidade de Itapoá em Santa Catarina pelo método de NMP para coliformes totais e termotolerantes e posterior isolamento e identificação bioquímica de *Escherichia Coli*

ISABELLE CRISTINE HALUCH

Análise microbiológica de amostras de água coletadas do oceano perto de saídas de esgoto no litoral da cidade de Itapoá em Santa Catarina

Versão original

Pré-projeto de pesquisa e inovação apresentado ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial do Paraná para obtenção do título de Técnico em Biotecnologia pelo curso Técnico em Biotecnologia.

Área de concentração:

Química

Orientador: Carlos Eduardo Sanchuki

Curitiba

Isabelle: HALUCH, Cristine

Análise microbiológica de amostras de água coletadas do oceano perto de saídas de esgoto no litoral da cidade de Itapoá em Santa Catarina

	Pré-projeto de pesquisa e inovação apresentado ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial do Paraná para obtenção do título de
	Técnico em Biotecnologia pelo curso Técnico em Biotecnologia.
	Área de concentração:
	Microbiologia
	nca Examinadora
Prof. Julgamento:	— Assinatura:
Prof.	<u> </u>
Julgamento:	Assinatura:
Prof.	<u> </u>
Julgamento:	Assinatura:

RESUMO

O Brasil ainda apresenta sérios problemas ambientais, principalmente em relação ao saneamento básico. O objetivo deste trabalho foi verificar e quantificar a presença de coliformes totais e termotolerantes, assim como *Escherichia Coli* na água do mar próxima a saídas de esgoto não tratado no litoral da cidade de Itapoá em Santa Catarina e utilizar os resultados para justificar a criação de uma empresa de análises ambientais. Foram coletadas 7 amostras de água de diversos pontos da praia, inclusive diretamente do esgoto. As amostras foram submetidas ao teste padronizado de NMP de coliformes segundo a FUNASA, com exceção da amostra C2 por falta de material, e isolamento e identificação bioquímica de *Escherichia Coli*. Os resultados mostraram contaminação por coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia Coli* na maioria das amostras coletadas, demonstrando que os banhistas estão em risco.

ABSTRACT

Brazil still has serious environmental problems, especially in relation to basic sanitation. The objective of this work was to verify and quantify the presence of total and thermotolerant coliforms, as well as Escherichia Coli in sea water close to untreated sewage outlets on the coast of the city of Itapoá in Santa Catarina and use the results to justify the creation of a environmental analysis company. Seven water samples were collected from different parts of the beach, including directly from the sewage. The samples were submitted to standardized coliform NMP test according to FUNASA, with the exception of sample C2 due to lack of material, and isolation and biochemical identification of Escherichia Coli. The results showed contamination by total and thermotolerant coliforms and Escherichia Coli in most of the collected samples, demonstrating that bathers are at risk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Mapa do litoral da cidade de Itapoá indicando os pontos de coleta Erro!
Indicador não definido.12
Figura 3.2 – Ponto em que desemboca no mar Erro! Indicador não definido. 13
Figura 3.3 – Rio no qual é despejado o esgoto sem tratamento no litoral de Itapoá $\mathbf{Erro!}$
Indicador não definido.13
Figura 3.4 – Placa de EMB com colônias suspeitas de <i>E. coli</i> à esquerda e placa de MC
com colônias suspeitas à direitaErro! Indicador não definido.14
Figura 3.5 –Placa de EMB à esquerda com colônia suspeita de $\it E.~coli$ isolada e à direita o
mesmo em meio MCErro! Indicador não definido.14
Figura 9.1 – Criança no local de coleta das amostras B1 e B2 Erro! Indicador não
definido.20
Figura 9.2 – Crianças brincando no rio contaminadoErro! Indicador não definido.20

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Horário de coleta das amostras Erro! Indicador não o	lefinido.12
Tabela $9.1 - Resultado da avaliação dos tubos de LST . Erro! Indicador não o$	lefinido.18
Tabela 9.2 – Resultado da avaliação dos tubos de VB	18
Tabela 9.3 – Resultado da avaliação dos tubos de EC	18
Tabela 9.4 – Tabela de relação de diluição de tubos positivos	19
Tabela 9.5 – Relação de tubos positivos e resultados em NMP/ml Erro! Indic	ador não
definido.	
Tabela 9.6 – Resultado do isolamento de $E.\ coli$ a partir de tubos ECErro! Ind	icador não
definido.	
Tabela 9.7 – Resultado do reisolamento das colônias suspeitas de E. coli	21
Tabela 9.8 – Resultado dos bioquímicos e catalase de colônias suspeitas de $\it E.a$	coli22
Tabela 9.9 – Resultado da coloração de Gram das amostras típicas de $E.\ coli$	Erro!
Indicador não definido.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla/abreviatura E. coli Escherichia Coli

Sigla/abreviatura BPW Água Peptonada Tamponada

Sigla/abreviatura LST Lauril Sulfato Triptose

Sigla/abreviatura EMB Eosina Azul de Metileno

Sigla/abreviatura MC MacConkey

Sigla/abreviatura EC E. coli

Sigla/abreviatura VB Verde Brilhante

Sigla/abreviatura LIA Ágar Lisina Ferro

Sigla/abreviatura MIO Motilidade Indol Ornitina

Sigla/abreviatura CS Citrato de Simmons

SUMÁRIO

1.	IN	TROI	DUÇÃO9
2.	OB	JETI	VOS
3.	MÍ	ÉTOD	OOS
	3.1.	Cole	eta das amostras
	3.2.	Qua	antificação de Coliformes pelo método do número mais provável (NMP) 13
	3.3.	Isol	amento de E. coli em placas13
	3.4.	Cole	oração de Gram
4.	SU	MÁR	IO EXECUTIVO15
5.	AN	IÁLIS	E DE MERCADO15
	5.1.	Segi	mento de clientes
	5.2.	Aná	llise da concorrência
	5.3.	Prir	ncipais fornecedores
6.	PL	ANO	OPERACIONAL 15
	6.1.	Estr	rutura física
	6.2.	Ativ	ridades operacionais
	6.2	.1.	Compra de materiais
	6.2	.2.	Produção dos meios necessários
	6.2	.3.	Coleta de amostras
	6.2	.4.	Processamento das amostras
	6.2	.5.	Descarte de resíduos
	6.3.	Rec	ursos humanos
7.	PL	ANO	FINANCEIRO
	7.1.	Cus	tos Pré-operacionais
	7.2.	Des	pesas e receitas
8.	PL	ANO	COMERCIAL
9.	CO	NCL	USÃO

1. INTRODUÇÃO

A situação ambiental no Brasil é preocupante, e dentre as causas existentes encontra-se a falta de saneamento básico que causa tanto danos ambientais quanto à saúde pública a nível nacional. (CHUEIRI, 2021).

Segundo os dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) de 2015 (IBGE, 2016) 85% das residências no país eram atendidas pela rede geral de abastecimento de água; a coleta de esgoto sanitário atendia em torno de 64% dos domicílios; e a coleta de resíduos sólidos atendia cerca de 90% das unidades domiciliares brasileiras.

O saneamento é fundamental para a saúde pública, já que pode prevenir casos de doenças que possuem relação direta com as condições de saneamento inadequado, deixando a população exposta a doenças infectocontagiosas, gerando custos para a saúde pública (de Menezes & Uchoa, 2011).

Muitas vezes, o esgoto doméstico é lançado diretamente em córregos, rios e mares, sem tratamento prévio, degradando assim as águas costeiras e causando danos aos ecossistemas marinhos. Somando-se ainda a esse problema, há atividade de banhistas que podem se contaminar nessas águas, evoluindo para um problema de saúde pública. (ALVESCHUEIRI; FORTUNATO, 2021).

Segundo a resolução CONAMA N° 357, são classificadas como águas salinas as águas com salinidade maior ou igual a 30%, no que se encaixam as águas oceânicas que banham o litoral brasileiro. Essas são utilizadas para banho, recreação, pesca e aquicultura, sendo necessário manter um certo padrão de qualidade da água, tanto para garantir a segurança das pessoas quanto para assegurar a estabilidade dos ecossistemas marinhos.

A água contaminada com efluentes de esgoto não tratados carrega inúmeros microrganismos patogênicos, entre eles os chamados Coliformes termotolerantes, que segundo a resolução CONAMA N° 357, são bactérias gram-negativas em forma de bacilos, oxidase – negativas que são capazes de fermentar a lactose nas temperaturas de 44° - 45°C, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais de sangue quente, também podem ocorrer em solos, plantas ou outras origens que não tenham sido necessariamente contaminadas por material fecal. Nesse grupo encontramos bactérias indicadoras de contaminação formados pelos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que podem causar doenças. Elas se dividem em coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, que é um subgrupo dos coliformes totais. Esse último é composto por

enterobactérias fermentadoras de lactose descritas acima, já o subgrupo é formado por bactérias capazes de fermentar a lactose a 44,5-45,5°C, que também incluem bactérias não fecais. Dentro desses grupos é importante destacar as bactérias do gênero *Enterococcus* que tem como característica a resistência a condições adversas do ambiente como concentração de cloreto de sódio à 6,5%, pH de cerca de 9,6 e temperaturas entre 10-45°C.

Segundo Pelzcar (1996) o grupo de coliformes foi escolhido como indicador de contaminação devido à sua presença da fezes de animais de sangue quente, como já mencionado, e sua presença na água tem ligação direta com o nível de contaminação fecal.

Outro microrganismo que merece atenção pelo seu potencial em causar doenças e a bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) que, segundo Souza, Melo, Carvalho, Menezes, Melo e Monteiro (2016) foi a primeira categoria de *E. coli* conhecida por causar diarreias e ainda hoje está associada a surtos de diarreia infantil. Sua presença em efluentes contaminados por esgoto doméstico é esperada pois são encontradas exclusivamente no intestino humano (CONAMA N° 357).

Itapoá, o município escolhido para a coleta das amostras, fica localizado no estado de Santa Catarina na região Nordeste do estado e região Sul do Brasil e é banhado pelas águas do Oceano Atlântico. Segundo o IBGE 2021(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a cidade possui 21.766 pessoas e recebe milhares de turistas durante a temporada. Foi escolhido devido à alta atividade turística e o despejo de esgoto doméstico sem tratamento nas águas costeiras.

Tendo em vista essas informações, a proposta é a criação de uma empresa que fornece serviços de análises ambientais. Foi realizada uma análise microbiológica visando identificação e contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP e isolamento e identificação bioquímica de Escherichia Coli isoladas da água do mar da cidade de Itapoá em Santa Catarina que ficam próximas a saídas de esgoto não tratado.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo a análise da água do mar próxima a saídas de esgoto no litoral da cidade de Itapoá em Santa Catarina para avaliar a presença e fazer a quantificação de coliformes totais e termotolerantes, assim como *Escherichia Coli* e através dos resultados justificar a criação de uma empresa de análises ambientais.

3. MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas segundo o manual de coleta de água da Funasa, sendo coletadas duas amostras de cada um dos três locais (A, B e C) indicados no mapa da figura 3.1, e uma amostra coletada diretamente do rio (Ponto R).



Fonte: Google Maps

Figura 3.1- Mapa do litoral da cidade de Itapoá indicando os pontos de coleta.

Para a coleta foram calçadas luvas, as mãos foram higienizadas com álcool 70%. Os frascos foram abertos e fechados somente dentro da água, a aproximadamente 30 cm de profundidade da superfície. As amostras foram recolhidas no dia 15/11/2021 no litoral de Itapoá-SC, nos horários expressos na tabela 3.1.

Tabela 3.1-: Horário de coleta das amostras

Amostras	Local	Hora da coleta
A1 e A2	A	16:00
B1 e B2	В	16:15
R	R	16:13
C1 e C2	С	16:27

Os frascos foram acondicionados dentro de uma bolsa térmica para transporte, que continha gelo para preservação. Logo em seguida foram transferidas para o isopor no qual foram transportadas para o laboratório de Microbiologia da unidade SENAI- CIC em Curitiba-PR para análise no dia seguinte. O intervalo entre a coleta das amostras e o início das análises não ultrapassou 24 horas.

Na figura 3.3 é possível visualizar o rio e na figura 3.2 o ponto em que ele desemboca no mar.





Figura 3.2: Ponto em que desemboca no mar

Figura 3.3: Rio no qual é despejado o esgoto sem tratamento no litoral de Itapoá

3.2. Quantificação de Coliformes pelo método do número mais provável (NMP)

Para a realização do NMP as amostras foram diluídas 0,5:5. Na etapa da diluição em água peptonada tamponada (BPW) foram adicionados 12,5 ml de cada amostra em um schott com 112,5 ml de BPW, correspondente à diluição 10-1. Em seguida 0,5ml do Schott de diluição 10-1 foram adicionados a um tubo com 4,5 ml de BPW estéril, correspondente à diluição 10-2. Finalmente 0,5ml do tubo de diluição 10-2 foram adicionados ao tubo com 4,5 ml de BPW estéril, correspondente à diluição 10-3.

Na etapa seguinte, foi necessário transferir 0,5 ml de cada diluição do BPW e adicionar a três tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durhan invertidos correspondentes à diluição do BPW.

A amostra C2 permaneceu sem fracionamento do LST devido à falta de tubos para tal, já que foi decidido no momento da coleta trazer a amostra R, que não estava planejada.

Os tubos devidamente identificados foram colocados em estufa à 30°C juntamente com os tubos e garrafas de BPW, exceto os da amostra C2.

A avaliação dos tubos de LST foi feita aproximadamente 21 horas após a incubação, são considerados tubos positivos para coliformes os com meio turvo, formação de gás no tubo de Durhan e efervescência ao agitar.

Uma alçada de cada tubo positivo de LST foi transferida para um tubo contendo 5ml de caldo Verde Brilhante (VB) e um tubo com a mesma quantidade de Caldo *E. coli* (EC), ambos com tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram incubados à 30°C por 21 horas.

Após avaliação a quantidade de tubos positivos de VB e EC que apresentavam as mesmas condições de produção de gás, efervescência ao agitar e turbidez e comparar com a tabela de NMP, a concentração de coliformes foi estimada.

3.3. Isolamento de E. coli em placas.

Foi estriada uma alçada de cada tubo positivo de EC para um terço de uma placa de EMB e uma de MC, cada terço correspondente à uma triplicata da diluição. As placas foram incubadas à 30°C por 21 horas.

Após avaliação, as placas que apresentaram colônias típicas de *Escherichia Coli* (esverdeadas com brilho metálico no EMB e rosadas no MC) tiveram uma colônia suspeita por placa reisolada em placa de EMB, que posteriormente foi incubada à 30°C por 21 horas. A figura 3.4 mostra uma placa do isolamento com colônias suspeitas de *E. coli* em EMB à esquerda e uma placa com colônias suspeitas em MC à direita.

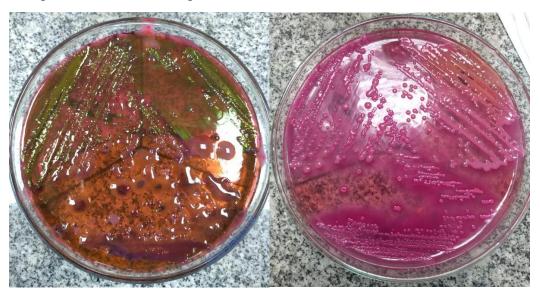


Figura 3.4: Placa de EMB com colônias suspeitas de E.coli à esquerda e placa de MC com colônias suspeitas à direita.

As placas de reisolamento sem contaminação e com colônias típicas foram submetidas ao teste da catalase, bioquímicos Ágar Lisina Ferro (LIA), Citrato de Simmons (CS) e Meio de MIO sem uréia (MIO). A figura 3.5 mostra uma placa de EMB à esquerda com colônia suspeita de *E. coli* isolada e à direita o mesmo em meio MC.

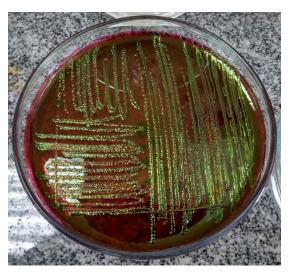




Figura 3.5: Placa de EMB à esquerda com colônia suspeita de E. coli isolada e à direita o mesmo em meio MC.

3.4. Coloração de Gram

As colônias que se apresentaram com características típicas de *E. coli* foram submetidas ao teste da coloração de Gram para constatar se eram Gram negativas ou positivas. A bactéria *Escherichia Coli* é Gram negativa, devendo corar em vermelho.

4. SUMÁRIO EXECUTIVO

- A empresa visa oferecer análises ambientais por métodos tradicionais comprovados, baratos e de qualidade para garantir a segurança da população que frequenta ou consome a água em questão.
- É de suma importância assegurar a qualidade microbiológica da água, seja ela para consumo, banho ou produção de pescado.
- A pesquisa realizada demonstra a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal em local sem restrições frequentado por moradores e turistas para banho, demonstrando a importância de se realizar tais análises.
- os microrganismos encontrados podem causar doenças em contato com a pele ou se ingeridos, o que pode levar à contaminação de pessoas e perda de atividade turística no local.

5. ANÁLISE DE MERCADO

5.1. Segmento de clientes

Os principais clientes serão pessoas físicas preocupados com sua saúde e bem-estar, órgãos públicos e privados que assegurem a segurança dos seus moradores e turistas, Institutos de pesquisa em busca de dados e informações e proprietários de criadouros de pescados interessados em saber da qualidade da água na qual criam seu produto.

5.2. Análise da concorrência

São vistos como principais concorrentes outros laboratórios de análises ambientais, especialmente aqueles localizados perto do litoral. As vantagens sobre esses laboratórios são a oferta de análise barata, inovação e pesquisa que beneficiem tanto a empresa quanto o cliente, e a organização e qualidade das análises. Já os pontos fortes da concorrência seriam a reputação, maior tempo de mercado e maior experiência na área.

5.3. Principais fornecedores

Os fornecedores seriam empresas que comercializam artigos plásticos, produtos para laboratório, papelarias, empresas coletoras de lixo.

6. PLANO OPERACIONAL

6.1. Estrutura física

Será necessário para a realização das atividades uma estrutura física bem estruturada, planejada e perto do litoral.

É preciso um conjunto de salas comerciais que incluam uma sala para o administrativo da empresa, um estoque de materiais, área do laboratório, refeitório e banheiros.

Para o escritório seriam necessárias mesas, cadeiras, computadores e material de escritório.

Quanto ao laboratório seriam necessários mesas, bancadas, armários, pias, computadores, fluxo laminar, autoclave vertical, estufa bacteriológica, geladeiras, cadeiras, balança semi-analítica, lixeiras, osmose reversa, barriletes de água, tudo isso distribuído em três salas: laboratório de análises, sala para preparo dos meios que serão utilizados e sala para limpeza e destinação do lixo.

6.2. Atividades operacionais

As principais atividades seriam a compra de materiais, produção dos meios necessários, coleta das amostras, processamento das amostras, descarte de resíduos e limpeza de materiais.

6.2.1. Compra de materiais

A compra de materiais seria feita pelo administrativo da empresa a partir de demandas de dentro e fora do laboratório.

6.2.2. Produção dos meios necessários

Seria realizada em uma sala dentro do laboratório que atenderia à demanda do laboratório de análises de acordo com a demanda de clientes.

6.2.3. Coleta de amostras

A coleta de amostras seria realizada pelo funcionário do laboratório de análises disponível que faria o transporte com seu próprio automóvel. A taxa seria cobrada proporcionalmente à distância de coleta do laboratório.

6.2.4. Processamento das amostras

Para o processamento das amostras seriam necessários pelo menos dois funcionários competentes para atender à demanda de laboratório.

6.2.5. Descarte de resíduos

O descarte de todos os tipos de resíduos será feito pelos funcionários do laboratório de análises. A coleta do lixo será feita por uma empresa especializada.

6.3. Recursos humanos

Ao todo haveria quatro funcionários na empresa, incluindo o fundador. Um trabalharia no administrativo, necessitando possuir curso superior e experiência na área, atendendo clientes, resolvendo questões internas etc. A limpeza de materiais e descarte de resíduos seria realizada pelos funcionários do laboratório de análises. Nesse último, trabalharia o fundador juntamente com outro funcionário que precisaria estar cursando o ensino superior sem necessidade de experiência na área, já que seria treinado internamente. Por fim, haveria um funcionário responsável pela coleta de amostras, que nas horas vagas, auxiliaria no laboratório de análises.

7. PLANO FINANCEIRO

7.1. Custos Pré-operacionais

Os custos estimados para a compra de materiais para laboratório, materiais de escritórios, EPIs, equipamentos, transporte e meios e soluções são de 36.722,70 reais.

7.2. Despesas e receitas

As despesas com salários de funcionários, materiais de laboratório, meios e soluções, transporte e processamento de amostras foram calculadas em 3.585 reais por mês.

A receita seria inicialmente de 7.800 reais por mês obtidos pela prestação de serviços e processamento de amostras. A receita cobriria os custos e ofereceria um lucro de 4.215 reais.

8. PLANO COMERCIAL

- Minha oferta será de serviços de análises microbiológicas ambientais.
- Os serviços serão distribuídos através de propagandas nas redes sociais e site na web.
- O diferencial será oferecer análises por métodos tradicionais seguros e baratos visando a segurança do cliente.
- O preço da análise seria de 50 reais por amostra mais o frete de 30 reais, totalizando 80 reais por amostra.
- Serão feitas campanhas sobre a importância de se fazer análises microbiológicas de água para a garantia da segurança e saúde da população, mostrando como exemplo, sem exposição, exames feitos para clientes que demonstraram contaminações.

9. CONCLUSÃO

A tabela 9.1 mostra os resultados obtidos dos tubos de LST, já as tabelas 9.2 e 9.3 expressam os resultados dos tubos de VB e EC, respectivamente. É utilizado o símbolo "+" para tubos positivos e "-" para os negativos.

Tabela 9.1-: Resultados da avaliação dos tubos de LST

Triplicata	A	В	C	A	В	C	A	В	C
Amostra/Diluição	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
R	+	+	+	+	+	+	ı	+	+
A1	+	-	+	-	-	•	+	-	-
A2	+	+	+	•	•	+	•	+	•
B 1	+	+	+	+	+	+	•	+	+
B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1	•	-	-	-	-	•	-	-	-

Tabela 9.2-: Resultados da avaliação dos tubos de VB

Triplicata LST	A	В	C	A	В	C	A	В	C
Amostra/Diluição	10-1	10-1	10-1	10-2	10-2	10^{-2}	10-3	10-3	10^{-3}
R	+	+	+	+	+	+		+	+
A1	+		+				+		
A2	+	+	+		•			+	
B1	+	+	+	+	+	+		-	-
B2	+	+	+	+	+	+	-	+	

Tabela 9.3-: Resultados da avaliação dos tubos de EC

Triplicata LST	A	В	C	A	В	C	A	В	C
Amostra/Diluição	10^{-1}	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
R	+	+	+	+	+	+		+	+
A1	+		+				+		
A2	+	+	+		+			+	
B1	+	+	+	+	+	+		-	-
B2	+	+	+	+	+	+	-	+	

Através dos dados obtidos na etapa de avaliação dos tubos de VB e EC foi possível comparar o número de tubos positivos por diluição mostrado na tabela 9.5, baseando-se na tabela 9.4 na qual estão as relações de tubos positivos com a quantidade de NMP/ml.

Desconfia-se que a amostra A1 diluição 10^{-1} triplicata B foi um erro ao pipetar em que seu tubo foi pulado. Já a amostra A1 diluição 10^{-1} triplicata C o tubo de Durhan estava invertido, porém apresentava turbidez e efervescência ao agitar e passou para a próxima etapa.

A amostra C2 apenas foi fracionada em BPW e não foi continuada, já que não havia tubos LST suficientes e sua duplicata, a amostra C1, apresentou resultado negativo em todos os tubos de LST, não sendo continuada.

Tabela 9.4-: Tabela de relação de diluição de tubos positivos

COMBINAÇÃO DE TUBOS +	NMP/g OU mL	INTERVENÇÃO DE CONFIANÇA (95%)		COMBINAÇÃO DE TUBOS +	NMP/g OU mL	INTERVENÇÃO DE CONFIANÇA (95%)		
	(Section Street,	MÍNIMO	MÁXIMO		, established	MÍNIMO	MÁXIMO	
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42	
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94	
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94	
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94	
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94	
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94	
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110	
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180	
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180	
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200	
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420	
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420	
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420	
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420	
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430	
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000	
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000	
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000	
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100	
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-	

Tabela 9.5-: Relação de tubos positivos e resultados em NMP/ml

Amostra	10-1	10-2	10-3	NMP/ml		
R	3	3	2	1.100		
A1	2	0	1	14		
A2	3	0	1	(38+75)/2=56,5		
B1	3	3	0	240		
B2	3	3	1	460		
C1	0	0	0	>0,3		

Pela diferença de crescimento nos tubos de VB e EC da amostra A2 foi feita uma média do crescimento baseada nos valores de cada.

Através dos resultados apresentados na tabela 9.5 é possível observar que as amostras coletadas de locais mais próximos ao rio apresentam uma concentração maior de coliformes. Também fica claro que a amostra R, coletada diretamente do rio, apresenta alta contaminação em relação às outras retiradas do mar.

As duplicatas da amostra B foram coletadas no local da praia logo à frente de onde o rio desemboca no mar, e apresentaram uma taxa elevada de coliformes, possivelmente oferecendo risco às pessoas.

Já as amostras A1 e A2 foram coletadas de um local pouco mais distante do rio, mas também apresentaram certo grau de contaminação.

Na figura 9.2 é possível observar crianças brincando no rio do qual foi retirada a amostra R. Já na figura 9.1 há pessoas se banhando no local de coleta das amostras B1 e B2.

Em relação ao isolamento e identificação de *Escherichia Coli*, os resultados do isolamento em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Ágar MacConkey (MC) a partir dos tubos positivos de Caldo *Escherichia Coli* (EC) estão expressos na tabela 9.6, sendo o símbolo "+" para colônias características de *Escherichia Coli* e "-" para colônias não características.





Figura 9-2: Crianças brincando no rio contaminado

Figura 9-1: Criança no local de coleta das amostras B1 e B2.

Tabela 9.6: Resultados do isolamento de E. coli a partir de tubos EC

Triplicata EC	A	Α	H	3	(7	A	4	I	3	(C	A	4	H	3	(7)
Diluição EC	1()-1	1()-1	10)-1	1()-2	1()-2	1()-2	10)-3	1()-3	10)-3
ID amostra		MC	•]	EMI	3		MC]	EMI	3		MC]	EMB	3
R	-	-		+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+		+	+	
A1	+	+		+	+								+			+		
A2	+	+	+	+	+	-							+	-		+	+	
B1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+			+		
B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				ı		

Analisando a tabela 9.6 é possível observar que grande parte das amostras apresentaram crescimento de colônias características de *E. coli* nas placas de EMB e MC provenientes de tubos EC positivos do teste de coliformes. Essas colônias suspeitas foram reisoladas em placas de EMB, sendo que foi retirada uma colônia suspeita por placa de cada diluição, tanto de MC quanto de EMB. Os resultados do reisolamento estão expressos na tabela 9.7. Considerando o símbolo "+" para colônias características de *Escherichia Coli* (esverdeadas com brilho metálico no EMB e rosadas no MC) e "-" para colônias não característica e o símbolo "*" para colônias contaminadas com outra bactéria.

C C Triplicata EC В В В \mathbf{C} A Α A Diluição EC **10**-1 10-1 10-1 10-2 10-2 10-2 **10**-3 **10**-3 **10**-3 Meio origem MC **EMB** MC **EMB** MC **EMB EMB** ID amostra R **A1** + **A2** + **B1** + **B2**

Tabela 9.7: Resultados do reisolamento das colônias suspeitas de E. coli

Algumas colônias tiveram contaminação por outra bactéria e não foram para os testes bioquímicos e de Gram.

Após obter colônias puras suspeitas, uma colônia foi submetida ao teste da catalase, bioquímicos Ágar Lisina Ferro (LIA), Citrato de Simmons (CS) e Meio de MIO sem uréia (MIO). O ágar lisina ferro é utilizado para teste de descarboxilação da lisina e teste de produção de H2S, para *E. coli*, a primeira deve ser positiva e a produção de H2S deve ser negativa. Já o Citrato de Simmons serve para identificar bactérias que têm o citrato como sua principal fonte de energia, e no caso da bactéria em estudo o resultado deve ser negativo. No caso do meio de MIO, ele permite a execução simultânea de três provas bioquímicas: descarboxilação da ornitina, motilidade e indol. No caso da *E. coli*, todas as três devem ser positivas. Como o reagente de Kovacs, que é utilizado para o teste de indol, estava vencido e não funcional o teste não pode ser realizado. Também não havia LIA o suficiente para todos os testes, então ele foi usado em apenas 7 das 15 colônias testadas.

Os resultados e bioquímicos utilizados estão expressos na tabela 9.8, na qual o símbolo "+" representa resultado positivo para o teste e "-" representa resultado negativo para o mesmo.

Tabela 9.8: Resultados dos bioquímicos e catalase das colônias suspeitas de E. coli

ID	Meio	Diluição	LIA	4	MIO		CS	Catalase
amostra	origem							
*	*	*	Des.	H ₂ S	Orn	Mot	*	*
			Lis					
R	EMB	10-3	-	-	-	-	-	+
R	EMB	10-2			+	+	-	-
R	EMB	10-1			+	+	-	+
R	MC	10-3	+	-	-	-	-	+
A1	EMB	10-3	+	-	-	-	-	+
A1	EMB	10-1			-	-	-	+
A1	MC	10-1			-	+	-	+
A2	MC	10-3			-	+	-	+
A2	EMB	10-3			+	+	-	+
A2	EMB	10-1	+	-	+	-	-	+
B1	EMB	10-1	+	-	+	+	-	-
B1	EMB	10-2			+	+	+	+
B2	MC	10-1	+	-	-	+	-	+
B2	MC	10-2	+	-	+	+	-	+
B2	EMB	10-1	-		-	+	-	-

Com base nos resultados apresentados na tabela 9.8, foram selecionadas colônias mais características de *E. coli* para a realização da coloração de Gram, cujos resultados foram expressos na tabela 9.9. O resultado esperado para *E. coli* é Gram negativa.

Tabela 9.9: Resultados da coloração de Gram das amostras típicas de E. coli

ID amostra	Meio origem	Diluição	Cor das células	Resultado
R	EMB	10-2	Vermelhas	Gram negativa
R	EMB	10-1	Vermelhas	Gram negativa
A1	MC	10-1	Roxas	Gram positiva
A2	MC	10-3	Vermelhas	Gram negativa
A2	EMB	10-3	Vermelhas	Gram negativa
A2	EMB	10-1	Vermelhas	Gram negativa
B1	EMB	10-1	Vermelhas	Gram negativa
B2	MC	10-1	Vermelhas	Gram negativa
B2	MC	10-2	Vermelhas	Gram negativa

Avaliando-se todos os dados apresentados é possível concluir que houve a presença de coliformes nas amostras R, A1, A2, B1 e B2, que correspondiam às áreas mais expostas ao despejo de esgoto, assim como a presença de *Escherichia Coli* nas mesmas amostras. Esses dados indicam contaminação por bactérias de origem fecal, e tendo em vista que essa praia não está sinalizada como imprópria e é frequentada por banhistas como mostram as figuras 9.1 e 9.2, há risco à saúde das pessoas expostas à água contaminada, sendo imprescindível a implementação de tratamento de esgoto e o monitoramento e controle da água do local, o que exige um serviço laboratorial, que seria oferecido na proposta de empresa de serviços deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Corrêa, Marcus Metri et al. Wastewater reuse in irrigation: short-term effect on soil carbon and nitrogen stocks in Brazilian semi-arid region. Revista Ambiente & Água [online]. 2021, v. 16, n. 1 [Accessed 7 August 2021], e2623. Available from: https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2623. Epub 10 Feb 2021. ISSN 1980-993X. https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2623.

Bayer, N. M., Uranga, P. R. R., & Fochezatto, A. (2021). Política Municipal de Saneamento Básico e a ocorrência de doenças nos municípios brasileiros. urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana, v. 13, e20190375. https://doi.org/10.1590/2175-3369.013.e20190375

RIVERA, Reinaldo; DE LOS RIOS, Patricio; CONTRERAS, Ángel. Relations fecal coliforms/ fecal Streptococci as indicators of the origin of fecal pollution in urban and rural water bodies of Temuco, Chile. **Cienc. Inv. Agr.**, Santiago, v. 37, n. 2, p. 141-149, Aug. 2010. Available from

">http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000200014. on 05 Aug. 2021. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000200014.

CASTRO, Mariana Tôrres de. Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes: qual a diferença? 2018. Disponível em: https://foodsafetybrazil.org/coliformes-totais-e-coliformes-termotolerantes-voce-sabe-diferenca/. Acesso em: 23 fev. 2021.

ENGENHARIA JUNIOR, P&q (ed.). **A Importância da Balneabilidade Em Nossas Vidas**. 2017. Disponível em: https://peqengenhariajr.com.br/a-importancia-da-balneabilidade/. Acesso em: 24 fev. 2021.

REIS, Carolina Siqueira dos; MARCUSSI, Adriana Paula Slongo; MENEZES, Mayara Alves de; ZANETTE, Guilherme Burigo; TAVARES, Pedro Vianna. CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA MARÍTIMA E DE MEXILHÕES EM UMA FAZENDA MARINHA DO MUNICÍPIO DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS, RJ. In: SILVA, Flávio Ferreira *et al.* **Qualidade de produtos de origem animal 2**. Ponta Grossa: Atena, 2019. Cap. 15,

FREITAS, Fernanda; NEIVA, Gabrielly Sobral; CRUZ, Edileide Santana da; SANTANA, Jerusa da Mota; SILVA, Isabella de Matos Mendes da; MENDONÇA, Fábio de Souza. Qualidade microbiológica e fatores ambientais de áreas estuarinas da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape (Bahia) destinadas ao cultivo de ostras nativas. 4. ed. Bahia: Eng Sanit Ambient, 2017. 729 p.

ALVESCHUEIRI, Débora Mury; FORTUNATO, Rafael Angelo. Sociedade Brasileira de Ecoturismo. **Turismo e esgoto domésticos na Ilha Grande(RJ): uma análise exploratória nas praias de Abraão e Aventureiro. Revista Brasileira de Ecoturismo**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 55-73, fev. 2021. Disponível em:

https://periodicos.unifesp.br/index.php/ecoturismo/article/view/10463/8239. Acesso em: 14 maio 2021.

SOUZA, Cintya de Oliveira; MELO, Thainara Roberta Barros; CARVALHO, Aline Correa de; MENEZES, Êmily Moreira; MELO, Caroline do Socorro Barros; MONTEIRO, Leni Célia Reis. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Revista Iec**, Ananindeua, v. 2, n. 7, p. 79-91, 6 abr. 2016. Disponível em:

http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v7n2/2176-6223-rpas-7-02-00079.pdf. Acesso em: 14 maio 2021.

CASAGRANDE, Mariana Froner. QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS E Clostridiumspp. E DETECÇÃO MOLECULAR DE Clostridium perfringens, Escherichia coliESalmonellaspp. EM PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DECARNE DE FRANGO. 2016. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016. Disponível em:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/135907/casagrande_mf_dr_jabo_int.pdf?s equence=4&isAllowed=y. Acesso em: 26 maio 2021.

GABLER, Andreia Caciano; NETO, Antonio Carlos Nogueira; CAVALCANTE, Priscila Souza. IDENTIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES NO RIO JARU NO MUNICIPIO DE JARU/RO. **Revista Saberes da Unjipa**, Ji-Paraná, v. 9, n. 2, p. 145-153, out. 2018. Disponível em:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiF5uuzs-jwAhWaGbkGHZ-

_BQ8QFnoECAcQAA&url=https%3A%2F%2Fpos.unijipa.edu.br%2Fdocumentos%2Frevista%2F09)%2520-

%2520IDENTIFICA%25C3%2587%25C3%2583O%2520DA%2520CONTAMINA%25C3 %2587%25C3%2583O%2520POR%2520COLIFORMES%2520TOTAIS%2520E%2520TE RMOTOLERANTES.pdf&usg=AOvVaw3qAOmgMhsvdpr57rf6TO_X. Acesso em: 26 maio 2021.

CHUEIRI, Débora Mury Alves; FORTUNATO, Rafael Angelo. Turismo e esgoto domésticos na Ilha Grande (RJ): uma análise exploratória nas praias de Abraão e Aventureiro. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 55-73, fev. 2021. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwijvcastOjwAhV7ILkGHfVbChYQFnoECAUQAA&url=https%3A%2F%2Fperi odicos.unifesp.br%2Findex.php%2Fecoturismo%2Farticle%2Fview%2F10463&usg=AOvVaw3VnkOoC9wSBR_S7NY_WF5j. Acesso em: 13 abr. 2021.

LESCRECK, Marina Camargo; PETRONI, Renata Gomes Gerais; CORTEZ, Fernando Sanzi; SANTOS, Aldo Ramos; COUTINHO, Pollyanna Oliveira; PUSCEDDU, Fabio Hermes. Análise da qualidade sanitária da areia das praias de Santos, litoral do estado de São Paulo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 777-782, 20 jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522016149550.

KAYSER, Melissa. **PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA**. Florianópolis: Desconhecida, . 3 p. (1). Disponível em:

http://docente.ifsc.edu.br/melissa.kayser/MaterialDidatico/Microbiologia/Aula%205.1%20Pre paro%20de%20Meios%20de%20Cultura.pdf. Acesso em: 26 maio 2021.

MALLET, Aline. **QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Aeromonas hydrophila EM ÁGUA DE PROPRIEDADES LEITEIRAS**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. Cap. 3. Disponível em:

http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2667/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Quantific a%C3%A7%C3%A30%20e%20identifica%C3%A7%C3%A30%20de%20Escherichia%20co li%2C%20Pseudomonas%20aeroginosa%20e%20Aeromonas%20hydrophila%20em%20%C 3%A1gua%20de%20propriedades%20leiteiras.pdf. Acesso em: 27 maio 2021.

PROLAB. Caldo Verde Bile Brilhante 2%. 2021. Disponível em:

https://www.prolab.com.br/produtos/meios-de-cultura/caldos-verde-bile-brilhante-2/caldoverde-bile-brilhante-2/. Acesso em: 27 maio 2021.

MACHADO, Célia de Fátima. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO E PATOGÊNICOS EM LÍQUIDOS LIXIVIADOS DO ATERRO SANITÁRIO DE BELO HORIZONTE. 2004. 140 f.

Monografia (Especialização) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ENGD-66ZQFH/1/celiafatima207.pdf. Acesso em: 14 jul. 2021.

HORN, Ruben V.; BEZERRA, Windleyanne G.A.; LOPES, Elisângela S.; TEIXEIRA, Régis S.C.; SILVA, Isaac N.G.; BONA, Mariana D.; HAVT, Alexandre; CARDOSO, William M.. Antimicrobial susceptibility and diarrheagenic diagnosis of Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from feral pigeons (Columba livia) captured in Fortaleza, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 2150-2154, nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5633. Acesso em: 17/08/2021.

LEITE, Mariana dos Santos; GUSMÃO, Amanda do Carmo; GONTIJO, Bruna de Alcântara Veloso; GARCIA, Patricia Guedes. Perfil de resistência aos antimicrobianos de Escherichia coli isoladas de amostras de urina de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 0-0, set. 2020. Revista Brasileira de Analises Clinicas. http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.202100877.

RTE, Flávia Bornancini Borges. **Perfil bioquímico de amostras de Escherichia coli isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: https://lume.ufrgs.br/handle/10183/13401. Acesso em: 28 out. 2021.

RATTI, Bianca Altrão; BRUSTOLIN, Camila Fernanda; SIQUEIRA, Thiago André; TORQUATO, Alex Sanches. PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS NO BAIRRO ZONA SETE, NA CIDADE DE MARINGÁ-PR. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, Não use números Romanos ou letras, use somente números Arábicos., 2011, Maringá. **Anais Eletrônico.** Maringá: Editora Cesumar, 2011. p. 0-0. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwip0JXPoO7zAhUcJrkGHRQIAK0QFnoECAMQAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.cesumar.br%2Fprppge%2Fpesquisa%2Fepcc2011%2Fanais%2Fbianca_altrao_ratti%2520%25281%2529.pdf&usg=AOvVaw3oMXnaaaUAo4BMHfZKZdxJ. Acesso em: 28 out. 2021.