



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA DOS CHUVEIROS DE QUATRO PRAIAS
DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.**

Sthefany de Jesus Ramos

Rio de Janeiro

2017.

**Projeto de monografia apresentado à Escola
Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio –
Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz)
como requisito parcial para aprovação no
Curso Técnico em Análises Clínicas.**

Orientador (a): Joseli Maria da Rocha Nogueira.

Co-orientador (a): Flávia Coelho Ribeiro Mendonça.

Rio de Janeiro

2017.

Dedico esse trabalho as minhas orientadoras, Joseli Nogueira e Flávia Ribeiro que, com dedicação, me apoiaram fortemente durante a caminhada de aprendizagem e conhecimento. Meu humilde obrigado, pois ambas mudaram a minha perspectiva de vida acadêmica e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) pelo apoio institucional na minha formação técnica.

Agradeço às minhas orientadoras, com quem compartilhei ideias, construções e dividi o ambiente de trabalho durante a realização do projeto, construindo junto um caminho para uma formação técnica de qualidade.

Agradeço a minha família pelo apoio e pelo incentivo à sempre persistir e acreditar nas possibilidades.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”*

José de Alencar.

RESUMO

A água é um recurso natural que tem enorme importância para a vida de todos os seres vivos. Atualmente, a poluição deste é um problema mundial enfrentado por todos. A poluição de mares e rios pode afetar diretamente a vida de banhistas, sendo os chuveiros disponíveis em barracas nas praias para o uso dos banhistas, agentes subjetivos desse processo. A contaminação bacteriana da água desses chuveiros pode causar diversos males à saúde dos que utilizam. O objetivo desse projeto foi analisar a contaminação por coliformes totais e/ou fecais, especificamente *Escherichia coli*, na água dos chuveiros de quatro praias cariocas escolhidas em função da balneabilidade e se pertencem a uma baía fechada ou se são oceânicas, nos períodos de julho de 2017 e dezembro de 2017. A metodologia para o desenvolvimento do projeto foi realizada nos Laboratórios de Microbiologia do DCB/ENSP-Fiocruz e DSSA/ENSP-Fiocruz, e consistiu não só no levantamento bibliográfico, mas também em técnicas de coleta de água, transporte, cultivo e detecção de coliformes.

Palavras-chave: Água, *Escherichia coli*, Poluição, coliformes, chuveiro de praia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 JUSTIFICATIVA	03
3 OBJETIVOS	04
• 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
4 REFERENCIAL TEÓRICO	05
• 4.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA	05
• 4.2 COLIFORMES FECAIS COMO INDICADORES DE POLUIÇÃO	07
• 4.3 A POLUIÇÃO DA ÁGUA POR MICRO-ORGANISMOS E OS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA	08
• 4.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA	10
5 MATERIAL E MÉTODOS	11
• 5.1 LEVANTAMENTOS DA LITERATURA SOBRE O TEMA	11
• 5.2 PESQUISA PRÁTICA	11
• 5.3 LOCAIS DE COLETA	11
• 5.4 COLETA DO MATERIAL	12
• 5.5 ANÁLISE DO MATERIAL COLETADO	14
.....	
• 5.6 MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	16
6 RESULTADOS	20
• 6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS QUE FORAM ENCONTRADAS	21
7 DISCUSSÃO	24
8 CONCLUSÃO	26
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Data, hora e local das coletas realizadas.....	12
QUADRO 2- Provas bioquímicas utilizadas para identificação e seus princípios.....	17
QUADRO3- Resultados obtidos a partir da leitura das metodologias realizadas para verificação da presença ou ausência e coliformes totais e fecais nas amostras de água.....	18
QUADRO4- Resultados da análise quantitativa das placas com a membrana semeada. Os resultados estão em ordem de coleta e de processamento das técnicas.....	18
QUADRO5- Resultados obtidos a partir da leitura das provas bioquímicas.....	19
QUADRO6- Resultados obtidos através da coloração de Gram.....	20
QUADRO7- Data, horário e local de coleta das amostras para confirmação da hipótese de contaminação.....	21
QUADRO8- Resultados obtidos após o processamento das amostras para confirmação da hipótese de contaminação.....	21

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mapa ilustrativo das praias de onde serão coletadas as amostras das quatro praias, uma de baía e três oceânicas.....	12
FIGURA 2- Membranas de 0.47 mm do filtro Millipore.....	16
FIGURA 3- Meios de cultura semeados após as incubações.....	16
FIGURA 4- Meios de cultura após incubação em estufas B.O.D.....	19
FIGURA 5- Materiais utilizados para a realização do método do substrato cromogênico....	20
FIGURA 6- Estufas B.O.D., local de incubação das dissoluções durante 24 horas.....	20
FIGURA 7- Amostras após a incubação de 24 horas a 35°C.....	22

1 INTRODUÇÃO

A água tem fundamental importância para a existência do planeta. É vital para a manutenção dos ciclos geológicos, biológicos e químicos, sendo também, essencial para a produção industrial e para a economia mundial. É um recurso natural de valor inestimável e fundamental para todos os seres vivos. Sendo assim, o uso desse elemento deve ser feito com consciência para que problemas ambientais, sociais e econômicos não ocorram, já que, apesar de seu grande valor, muitas são as formas de como ela pode se tornar poluída, gerando na atualidade um grande problema mundial (HORTA, 2009).

As fontes de poluição podem ser divididas em duas categorias: as fontes pontuais e as fontes não pontuais. Nas fontes pontuais, a poluição é cometida por fontes facilmente identificadas e conhecidas, ou seja, específicas, como por exemplo, o despejo de dejetos químicos e poluentes feito por fábricas, em rios e oceanos. Já nas fontes não pontuais, a poluição causada está relacionada à fontes não específicas, sendo essa poluição proveniente de diferentes pontos de lançamento, tornando-se de difícil controle. Alguns exemplos da poluição geradas por essas fontes, são, infiltração de agrotóxicos no solo, o despejo de lixo e também de esgoto não tratado em córregos e rios que, frequentemente, terminam nos oceanos (SALEMI, 2015).

Com a liberação de esgotos não tratados, ocorre a contaminação da água por micro-organismos e parasitos, que podem levar a ocorrência de doenças, como, esquistossomose (causada pelo *Schistosoma mansoni*), hepatite A (uma infecção viral oro-fecal), leptospirose (infecção bacteriana causada pela bactéria *Leptospira interrogans*) e também diarreias de diferentes etiologias (OLIVEIRA, 2013). Além de serem agentes causadores de doenças de veiculação hídrica, algumas bactérias, podem ser usadas como indicadores de poluição, como no caso do grupo dos coliformes totais e fecais. Segundo Cardoso, 2001, os coliformes totais são um grupo de bactérias que contêm bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulantes, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares, fermentam a lactose com produção de ácidos, aldeídos e gás a 35°C em 24-48 horas. Este grupo contém os seguintes gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Os coliformes termotolerantes ou coliformes fecais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 44°C em 24 horas, sendo a principal espécie dentro desse grupo a *Escherichia coli* (BETTEGA, 2006).

No município do Rio de Janeiro, uma quantidade significativa de esgoto não tratado desagua na Baía de Guanabara todos os dias (MERGULHÃO, CLAVERY, 2015). Isso é alarmante quando se pensa no meio ambiente e na Saúde Pública, pois a grande maioria das praias que

recebem água da baía é contaminada pelo esgoto e, conseqüentemente, pelos micro-organismos presentes nessas águas.

A facilidade dos banhistas em acessar às praias da região da zona sul do Rio de Janeiro, algumas sendo banhadas pela Baía de Guanabara, aumenta a preocupação de infecção destes por micro-organismos, já que as praias banhadas pela Baía tendem a ser mais poluídas. A presença de chuveiros nas praias é assegurada por lei para os banhistas cariocas que possuem a necessidade de utilizá-los (ALERJ, 2015), todavia não são facilmente encontrados registros de fiscalização dos mesmos. Chuveiros adjacentes aos que são disponibilizados pela prefeitura, estão dispostos na areia e estão ligados à barraqueiros. Os fatores de preocupação são o fato desses chuveiros não terem regulamentação exemplar e, conseqüentemente, nenhum tipo de fiscalização, apesar de serem os mais utilizados pelos banhistas, por serem mais práticos e gratuitos. Diferentemente dos que são disponibilizados pela prefeitura, que cobra uma taxa para utilização dos chuveiros dos postos. A falta de fiscalização não garante a qualidade da água dos chuveiros utilizados pelos banhistas, podendo assim, esses ficarem expostos à água contaminada.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, assim como em diversos países, há, dentre outros, um grande problema ambiental que é a poluição da água, tanto de rios quanto de mares. No Rio de Janeiro, uma grande quantidade de esgoto é despejada diariamente na Baía de Guanabara, levando a contaminação de praias adjacentes. Essa contaminação é um fator de risco para os banhistas, pois devemos considerar que mesmo sem fazer uso direto da água do mar, os usuários das praias também podem estar correndo um possível risco, uma vez que a maior parte utiliza os chuveiros de barraqueiros para se refrescar.

Com base nessas afirmações, é de relevante importância analisar os níveis de contaminação e qualidade das águas desses chuveiros; a fim de contribuir para o maior conhecimento sobre os fatores de risco da poluição destas águas por micro-organismos potencialmente patogênicos para a saúde do ser humano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar a contaminação por coliformes totais e fecais, especificamente *Escherichia coli*, na água dos chuveiros de praias cariocas e a importância do controle da qualidade dessa água para a Saúde Pública.

3.2 Objetivos específicos:

- Descrever os coliformes totais e fecais, e a importância dos coliformes fecais como indicadores de poluição.
- Descrever os aspectos gerais da *Escherichia coli*, e sua importância como indicador de contaminação fecal.
- Diagnosticar a presença de coliformes totais e fecais (análise bacteriológica) na água dos chuveiros de quatro praias (três oceânicas e uma banhada pela Baía de Guanabara) através de duas metodologias, a técnica da membrana filtrante e o método do substrato cromogênico.
- Discutir a importância para a Saúde Pública do risco da contaminação por coliformes totais e fecais na água dos chuveiros analisados.
- Comparar a eficácia das metodologias aplicadas na detecção de coliformes na água.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Análise microbiológica da água

A presença de micro-organismos e de substâncias químicas na água pode afetar a sua potabilidade, tornando-a inapropriada para o consumo. Logo, o exame microbiológico da água tem extrema importância para o ser humano. Seja a água utilizada para higiene, para o lazer ou para a alimentação, em ambos os casos, verificar a qualidade dessa água previne que a mesma seja prejudicial à saúde do indivíduo que a consome (VALENTE, 2013).

O objetivo do exame microbiológico da água é verificar os níveis de contaminação e, conseqüentemente, a potabilidade da mesma. Desta forma, busca esclarecer a ausência ou a presença de risco para a saúde do ser humano a partir do seu consumo, através de análises qualitativas e quantitativas da presença de micro-organismos (VALENTE, 2013). O método leva em consideração os padrões de potabilidade da água estabelecidos na Portaria 36/90 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1990)

A poluição da água geralmente é proveniente da contaminação por fezes humanas ou de outros animais. Um exemplo claro, já citado na introdução, é a enorme quantidade de esgoto despejada na Baía de Guanabara todos os dias (MERGULHÃO, CLAVERY, 2015). A contaminação da água por esgotos torna-se um fator preocupante, pois diversos tipos de organismos potencialmente patogênicos se desenvolvem nesse meio, como é o caso dos coliformes totais.

O grupo dos coliformes totais engloba os principais patógenos que causam doenças transmitidas pela água, dentre eles as bactérias do grupo coliformes incluem os gêneros: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (BETTEGA et al., 2006).

A presença de bactérias do grupo coliforme em água potável tem sido vista como um indicador de contaminação fecal relacionado ao tratamento inadequado ou inabilidade de manter o desinfetante residual na água distribuída (LECHAVALLIER, WELCH, SMITH, 1996). O outro subgrupo dos coliformes são os coliformes termotolerantes ou fecais, que, são capazes de fermentar a lactose a 44 - 45°C ($\pm 0,2$) em 24 horas, produzir indol a partir do triptofano, não possuem a enzima oxidase, não hidrolisam a uréia e apresentam atividade das enzimas β -galactosidase e β -glucuronidase (GUERRA et al., 2006). Atualmente sabe-se, entretanto, que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (MOURA, ASSUMPCÃO, BISCHOFF, 2009), dos quais dois gêneros (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal (SILVA et al., 2005).

Por esse motivo, a presença de coliformes termotolerantes em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E. coli*, porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E. coli* dentro do grupo fecal. (SILVA et al., 2005). Por estas razões, a *Escherichia coli* é o microrganismo mais estudado em todo o mundo, considerado o principal representante do grupo (ZIESE et al., 1996). A ocorrência de *E. coli* é considerada um indicador específico de contaminação fecal e indica a possibilidade da presença de patógenos entéricos (GUERRA et al., 2006)

A contaminação da água, pode ocorrer pelo despejo de resíduos químicos por indústrias, infiltração do chorume no solo em grandes aterros de lixo e também pelo despejo de esgotos não tratados. A verificação da presença dos coliformes totais, na água, possibilita a medição de sua potabilidade e ainda, indica a fonte de poluição (FREITAS, 2001).

4.2 Coliformes fecais na saúde Pública

Como já explicado, os coliformes fecais ou termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais. Tem como características suportar altas temperaturas (acima de 40°C (graus Celsius)), por isso o termo "termotolerantes", vivem em estado de simbiose com os seres humanos, bois, gatos, porcos e outros animais de sangue quente e são excretados nas fezes em grande quantidade (CARLONI, 2014).

Quando se trata de Saúde Pública, os coliformes termotolerantes são os principais indicadores de poluição utilizados como parâmetro para medir a qualidade da água (ALMEIDA, 2004). Essa preferência tem como explicação o fato de que o despejo de esgotos não tratados é a maior fonte de poluição de águas naturais, aumentando a concentração de coliformes fecais, principalmente em metrópoles, como o Rio de Janeiro. A poluição da água por esgotos não tratados é um problema de Saúde Pública, pois acarreta números problemas durante todo o percurso que a água contaminada faz, atingindo a natureza e conseqüentemente, os seres humanos (REDONDO, 2015)

Dentro do subgrupo de coliformes fecais existem diversas espécies, entretanto, a mais frequente e responsável pelo maior número de doenças causadas pela contaminação da água é a espécie *Escherichia coli*. Essa espécie pode ser encontrada no organismo dos seres humanos mantendo uma relação de simbiose, sem causar nenhum tipo de distúrbio, entretanto, quando presente na água, indica contaminação fecal. Ao ingerir alimentos ou água contaminadas com *E. coli*, os indivíduos estão susceptíveis a desenvolver vários tipos de doenças, como por exemplo, gastroenterite, infecção urinária, cistite, diarreias entre outras doenças gastro-intestinais (FRAZÃO, 2016).

4.3 A poluição da água por micro-organismos e os riscos para a Saúde Pública.

A água tem fundamental importância na vida dos seres humanos, porém a poluição de rios e mares é cada vez mais frequente. Essa poluição tem diversas causas, sendo a falta de saneamento básico a mais frequente e decorrente do processo de urbanização crescente nas grandes metrópoles, como é o caso do Rio de Janeiro. Os impactos ambientais causados pelo processo de globalização acabam sendo prejudiciais não só para o meio ambiente, mas também para a saúde do ser humano que está inserido no processo (MIRANDA, 2008). O aumento desordenado da ocupação do solo, tem como consequência a compactação do solo e impossibilita a infiltração e a recarga de cursos de água nos solos, contribuindo para a poluição (GODOI et al, 2014).

A poluição da água torna-se um problema alarmante para a Saúde Pública, pois a transmissão de doenças de veiculação hídrica aumenta. Segundo Godoi e colaboradores (2014), a relação da contaminação de águas naturais e o desenvolvimento de enfermidades nas populações é muito próxima, principalmente nas populações que não possuem o atendimento necessário de saneamento básico .

Como já dito anteriormente, essa poluição acarreta problemas alarmantes, não só para o meio ambiente, mas também para a saúde da população, pois a água se torna um veículo da disseminação de diversas doenças (MS, 2006), como por exemplo, as doenças gastrointestinais como, diarreias sanguinolentas, diarreias coleriformes e outros vários agravos, causadas diretamente pelos coliformes fecais (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

Essas doenças atingem a população no geral, mas principalmente a população que entra em contato direto com a água contaminada e, por consequência, com os agentes infecciosos. Esse contato pode ocorrer de diversas maneiras, seja durante a higiene pessoal ou higiene dos alimentos, ou até mesmo, durante o lazer, como por exemplo nos banhos de chuveiro que são disponibilizados por barraqueiros nas praias cariocas.

A contaminação das águas subterrâneas também é preocupante, pois além de ser prejudicial a natureza, pode vir a atingir diretamente o ser humano (GODOI et al, 2014). Ao utilizarem os chuveiros disponibilizados por barraqueiros, os banhistas passam a estar expostos a uma possível infecção, pelo fato desses chuveiros serem abastecidos através do bombeamento de águas subterrâneas e possivelmente salobras.

Os chuveiros têm um papel fundamental para os frequentadores da praia, tornando-se veículos da disseminação dessa contaminação, pois a fiscalização e controle de qualidade das águas que os abastecem deveriam ser feitas com periodicidade, entretanto não ocorrem e a

confiabilidade de que a água é realmente própria para o uso humano é duvidosa (CARLONI, 2014).

O contato direto com a água dos chuveiros pode ser potencialmente infeccioso para o ser humano, já que a contaminação das águas por coliformes fecais e totais chega diretamente aos banhistas, podendo causar diversos danos à saúde, como já foi citado. A importância da fiscalização para a prevenção da disseminação das doenças de veiculação hídrica, para o melhor aproveitamento da água usada pelos banhistas para o lazer ainda está em processo de discussão pelo poder público desde 2012 (BRITO, 2012) e precisa de deliberação imediata, já que as pessoas que utilizam os chuveiros não possuem qualquer orientação sobre o risco a que estão expostas.

4.4 Métodos de detecção de coliformes em água

Os procedimentos convencionais comumente usados para enumeração de coliformes são a Técnica de Múltiplos Tubos e Técnica de Membrana Filtrante. Onde o primeiro método é trabalhoso, exigindo grande número de vidrarias e meios de cultivo. A Técnica de Filtração em Membrana, embora mais simples utiliza material de custo elevado e não é indicado para águas com alto índices de turbidez, pois dificulta o processo de filtração. Os métodos rápidos como o método do substrato cromogênico, apareceram para abreviar o tempo necessário para a obtenção dos resultados, simplificando o trabalho do pesquisador (FERNANDES; GOIS, 2015).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Levantamento da literatura sobre o tema:

Foi realizado o levantamento bibliográfico sobre o tema exposto, com pesquisas em artigos científicos de periódicos indexados, dissertações e teses sobre esse tema, nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, publicados no período de 1980-2017, por meio da busca nas bases de dados Google Scholar, Lilacs e Scielo. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave nesta busca: Água, *Escherichia coli*, Poluição, coliformes, chuveiro de praia.

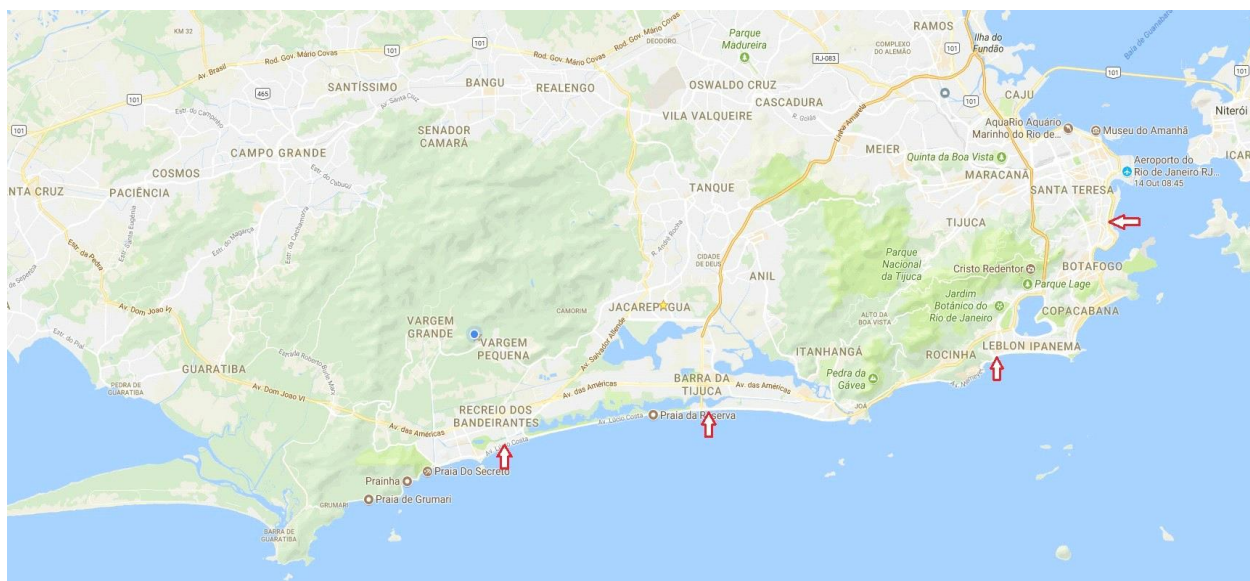
5.2 Pesquisa prática

Além do levantamento teórico, realizamos neste trabalho, uma pesquisa prática para evidenciar a presença de coliformes totais e fecais seguindo os objetivos já descritos no item 3.

5.3 Locais de coleta:

A escolha das praias para coleta da água, foi realizada com base em três parâmetros, o primeiro considerou a disponibilidade de chuveiros para utilização por banhistas e os outros consideraram a localização da praia, com base em um gradiente de proximidade da baía de Guanabara e também a facilidade de acesso para a coleta. Os pontos escolhidos foram definidos de acordo com o mapa abaixo e estão descritos por prioridade:

Figura 1: Mapa ilustrativo das praias de onde serão coletadas as amostras das quatro praias, uma de baía e três oceânicas. Fonte: (REDONDO, 2015).



As praias de onde foram coletadas as amostras são, a praia do Flamengo, na altura do posto três, sendo a única banhada pela baía, a praia do Leblon, na altura do posto doze, também situada na Zona Sul do Rio do Janeiro, a praia da Barra da Tijuca, na altura do posto oito, na Zona Oeste do Rio de Janeiro e a praia do Recreio dos Bandeirantes, na altura do posto dez, também localizada na Zona Oeste.

5.4 Coleta do material.

Os materiais utilizados para a realização da coleta foram: caixa térmica com capacidade de 5L; Gelo em gel, para a refrigeração das amostras; Fracos shot; estéreis para o armazenamento da água; Caneta pilot, para a identificação das amostras, ainda no local de coleta; Gaze; Àcool 70%.

As coletas iniciais do material de estudo, foram realizadas no mês de Julho de 2017 (Quadro 1).

Nos casos das praias com fluxo de água não contínuo dos chuveiros, a água foi coletada após uma higienização prévia, do local de saída, com álcool 70%. Após esse procedimento foi aberto o registro deixando a água escorrer durante 1 ou 2 minutos. As coletas das amostras de água foram realizadas em frasco estéril com tampa de rosca, que foi completado com pelo menos 3/4 de seu volume e imediatamente tampado, o mesmo foi identificado com o ponto de coleta, hora da coleta, e o número da amostra.

O frasco foi colocado na caixa de isopor com gelo e levado ao laboratório no mesmo dia para análises.

Quadro 1: data, hora e local das coletas realizadas.

AMOSTRAS	DATA	HORÁRIO	LOCAL
1	24/07/2017	10h03min	chuveiro na praia do Leblon, Posto 12, na altura da rua João Lira, Rio de Janeiro, RJ.
2	24/07/2017	11h13min	chuveiro na praia do Flamengo, Posto 3, Rio de Janeiro, RJ.
3	31/07/2017	09h30min	chuveiro na praia do Recreio, posto 10, Rio de Janeiro, RJ.
4	31/07/2017	10h10min	chuveiro na praia da Barra da tijuca, posto 8, Rio de Janeiro, RJ.

Os pontos de coleta situados no Leblon, e no Flamengo tiveram que ser repetidos em dezembro para confirmação de resultados suspeitos de contaminação (Quadro 7).

5.5 Análise do material coletado.

As análises das águas dos chuveiros foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) e no Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA) da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP/ FIOCRUZ, no mesmo dia em que as amostras foram coletadas. Realizou-se não só a detecção de coliformes totais e fecais, especialmente a bactéria *Escherichia coli*, mas também uma comparação de duas técnicas de detecção destes micro-organismos, considerando a eficácia na detecção e a sensibilidade das duas técnicas através da comparação dos resultados.

As técnicas utilizadas compreenderam as seguintes etapas:

Técnica de membrana filtrante: Essa técnica consiste na passagem da água por um filtro que contém uma membrana estéril com porosidade de 0.47mm (Figura 2), com o intuito de reter as bactérias na mesma e semeá-las em um meio de cultura para observar o crescimento bacteriano ou a ausência dele.

Os materiais utilizados para a realização da técnica foram: Bico de Bunsen; filtro autoclavável Millipore®; Membranas Millipore® 0.47mm; Pinças estéreis; Seringas descartáveis estéreis de 60mL; meio de cultura CHROMagar distribuído em placas de Petri; Becker de 100mL para descarte de material; EPI'S necessários: jaleco e luvas.

O passo a passo foi realizado de acordo com o estabelecido pelo Manual Prático de Análise da Água, Funasa, 2013 (VALENTE, 2013).

A passagem integral desse material por um filtro Millipore, de membrana 0.47mm, já em laboratório foi realizada no Bico de Bunsen, respeitando o perímetro de proteção.



Figura 2: membranas de 0.47 mm do filtro Millipore. Fonte: (RAMOS, 2017).

A retirada da membrana 0.47mm do filtro, foi feita assepticamente no Bico de Bunsen e colocada, com o auxílio de uma pinça estéril, no meio de cultura indicador Difco® CHROMagar Orientation.

O meio foi incubado por aproximadamente 48 horas, a aproximadamente 36°C, em estufas B.O.D

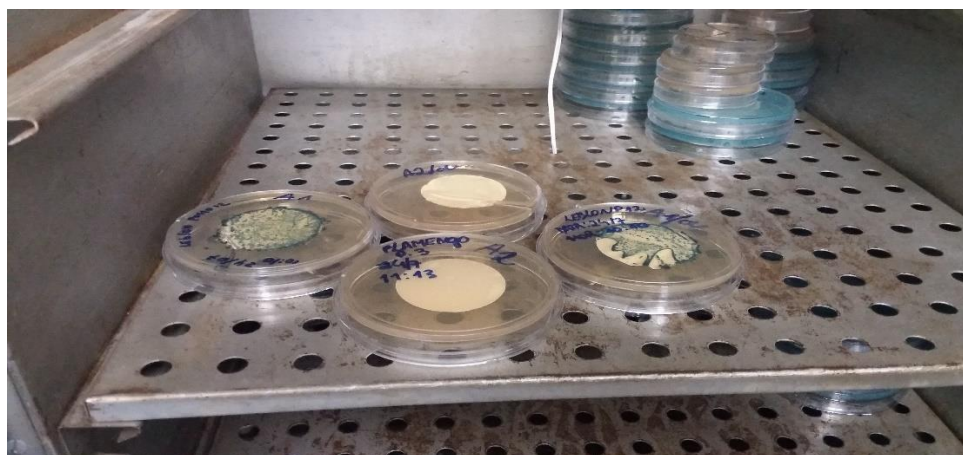


Figura 3: meios de cultura semeados após as incubações. Fonte: (RAMOS, 2017).

Foram realizadas as análises de 24 e 48 horas para verificação do crescimento ou a ausência do crescimento bacteriano.

5.6 Método de identificação das bactérias.

A identificação inicial das bactérias que cresceram nas placas foi feita a partir da coloração de Gram e posteriormente cada colônia isolada foi crescida em caldo BHI.

O método da coloração consiste em um esfregaço proveniente de uma colônia isolada, de preferência, e uma gota de salina em uma lâmina. Após isso, a lâmina é corada em diferentes etapas, respeitando o tempo necessário para cada reagente. O objetivo da coloração é identificar, microscopicamente as estruturas das bactérias e seu potencial no Gram, separando assim, tais bactérias em grupos, como por exemplo, bacilos Gram negativos ou cocos Gram positivos. Essa técnica foi realizada seguindo as recomendações de Nogueira e Souza Miguel (2010).

Após a informação morfo-tintorial, uma nova semeadura foi realizada em meio de cultura CHROMagar para confirmação da pureza, cada isolado foi submetido às provas bioquímicas constantes no Quadro 2:

Quadro 2: provas bioquímicas utilizadas para identificação e seus princípios.

Meio de crescimento MILI	Verificar motilidade, Indol (com auxílio do reativo de kovacs) e L-lisina descarboxilase.
Meio de crescimento SIM	Verificar H ₂ S, Indol (com auxílio do reativo de kovacs) e motilidade.
Meio de crescimento Citrato	Verificar se o micro-organismo é citrato positivo ou negativo.
Meio de crescimento Glicose	Verificar se o micro-organismo fermenta ou não a glicose.

Método do Substrato Cromogênico: Essa técnica consiste em verificar a presença de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água. A verificação é possível ao adicionar-se o substrato cromogênico à amostra e considerar uma mudança de coloração do líquido, podendo ser amarela como positiva para coliformes totais e, se positiva para coliformes totais, em câmara de luz UV, tornar-se azul fluorescente, sendo positiva também para *E. coli*.

O passo a passo foi realizado de acordo com o estabelecido pelo Manual Prático de Análise da Água, Funasa, 2013 e realiza-se de acordo com o seguinte passo a passo (VALENTE, 2013):

Todo o processo foi realizado na cabine de segurança biológica e foram utilizados os seguintes materiais estéreis: vidrarias para dissolução; provetas de 100mL; água deionizada; pipeta automática de 200µL; Controle positivo (*Escherichia coli*) e controle negativo (*Staphylococcus aureus*), que foram preparados durante o processamento de amostras. Além disso foram utilizadas ponteiras estéreis e becker de 100mL para descarte (Figura 5). Os EPI (Equipamento de proteção individual) utilizados para realização dessa pesquisa foram jaleco descartáveis, luvas descartáveis, óculos de segurança e touca descartáveis.

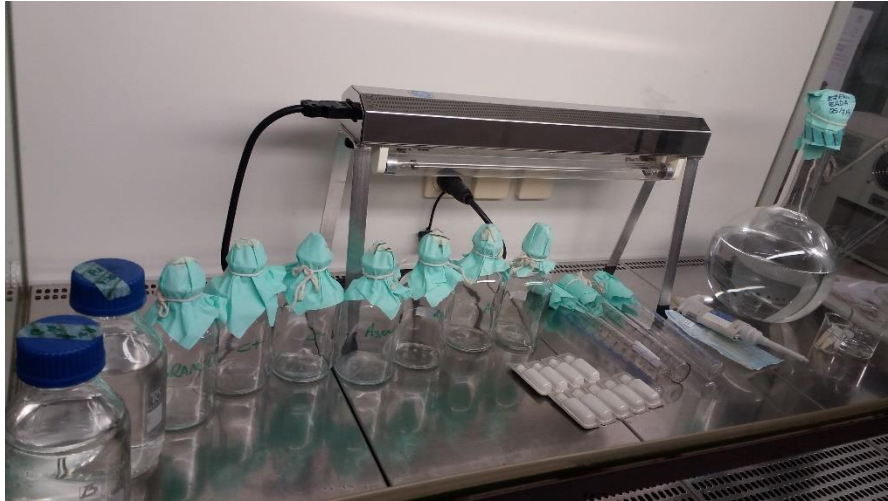


Figura 5: materiais utilizados para a realização do método do substrato cromogênico. Fonte: (RAMOS, 2017)

Antes do processamento das amostras, foram feitos os controles positivo e negativo, ambos são norteadores no momento de leitura dos resultados, sendo indispensáveis.

A passagem do material do frasco de coleta para o frasco de dissolução foi realizada com o auxílio de uma proveta de 100 mL e de uma vidraria de dissolução.

Na vidraria de dissolução foi adicionado o conteúdo de um frasco contendo o Substrato Cromogênico Colilert®.

Agitou-se a vidraria com cautela, até que todo o substrato estivesse dissolvido, obtendo coloração transparente (Figura 6).

Incubou-se à 35°C durante 24 horas, em estufa B. O. D. (Figura 6).



Figura 6: Estufas B.O.D., local de incubação das dissoluções durante 24 horas. Fonte: (RAMOS, 2017)

Observou-se a mudança de coloração do líquido, com o parâmetro de comparação de controles positivo e negativo. Sendo amarela como positiva para coliformes totais e, em alguns casos de positiva para Coliformes totais, observou-se em câmara de luz UV, para verificação da presença de *E.coli*, com coloração azul fluorescente (Figura 8).



Figura 7: Amostras após a incubação de 24 horas a 35°C. Fonte: (RAMOS, 2017).

6. RESULTADOS

O Quadro 3 contempla os resultados obtidos nas duas técnicas:

Quadro 3: Resultados obtidos a partir da leitura das metodologias realizadas para verificação da presença ou ausência e coliformes totais e fecais nas amostras de água.

AMOSTRAS	MÉTODO DO SUBSTRATO	MEMBRANA FILTRANTE 24 HORAS	MEMBRANA FILTRANTE 48 HORAS
Amostra 1 e Amostra 1/duplicata	Positivo para coliformes totais e negativa para <i>E. coli.</i>	Crescimento de colônias azuis escuras e brancas	Permaneceram os dois tipos de bactérias
Amostra 2 e Amostra 2/duplicata	Negativo para ambos.	Não houve crescimento	Crescimento de colônias azuis escuras e amarelas.
Amostra 3 e Amostra 3 duplicata	Negativo para ambos.	Não houve crescimento.	Não houve crescimento.
Amostra 4 Amostra 4 duplicata	Negativo para ambos.	Não houve crescimento.	Não houve crescimento.

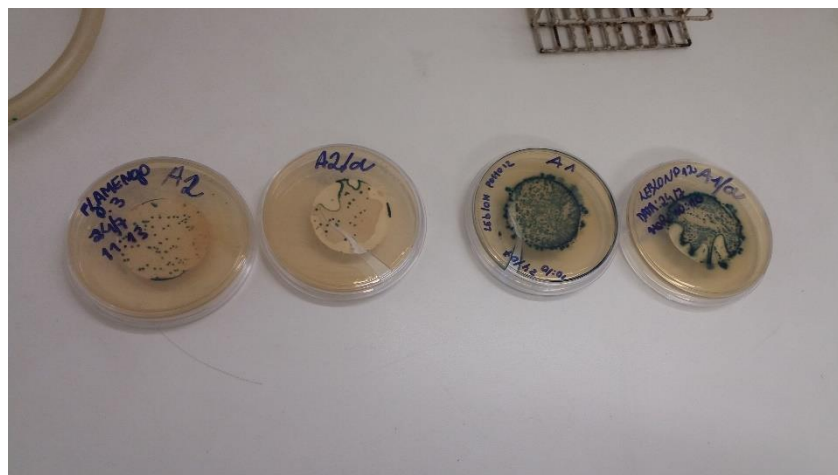


Figura 4: meios de cultura após incubação em estufas B.O.D. Fonte: (RAMOS, 2017).

Quadro 4: Resultados da análise quantitativa das placas com a membrana semeada. Os resultados estão em ordem de coleta e de processamento das técnicas.

Amostra 1	INCONTÁVEL
Amostra 1/d	INCONTÁVEL
Amostra 2	221 UFC/ 100 mL
Amostra 2/d	58 UFC/ 100 mL
Amostra 3	NÃO HOUVE CRESCIMENTO
Amostra 3/d	NÃO HOUVE CRESCIMENTO
Amostra 4	NÃO HOUVE CRESCIMENTO
Amostra 4/d	NÃO HOUVE CRESCIMENTO

6.1 Identificação das bactérias que foram encontradas.

Os resultados das provas bioquímicas utilizadas para identificação, estão dispostos no quadro abaixo e foram lidos com 24 horas de incubação dos meios de crescimento.

Quadro 5: Resultados obtidos a partir da leitura das provas bioquímicas.

Meios Amostras	MILI	SIM	CITRATO	GLICOSE
Amostra 1: colônias azuis escuras.	Indol: - Lisina: - Motilidade: +	H ₂ S: - Indol: - Lisina: -	Citrato: +	Não fermentador
Amostra 1: colônias brancas.	Indol: - Lisina: + Motilidade: -	H ₂ S: - Indol: - Lisina: +	Citrato: +	Não fermentador
Amostra 2: colônias azuis escuras.	Indol: - Lisina: + Motilidade: -	H ₂ S: - Indol: - Lisina: +	Citrato: -	Não fermentador
Amostra 2: colônias amarelas.	Indol: - Lisina: + Motilidade: -	H ₂ S: - Indol: - Lisina: +	Citrato: -	Não fermentador

Os resultados analisados na microscopia óptica das amostras 1 e 2 estão ordenados no quadro abaixo.

Quadro 6: resultados obtidos através da coloração de Gram.

AMOSTRAS	GRAM
Amostra 1: colônia azul escuro.	Bacilos Gram -
Amostra 1: colônia branca.	Bacilos Gram -
Amostra 2: colônia azul escuro.	Bacilos Gram -
Amostra 2: colônia amarela;	Bacilos Gram -

Após a realização das análises, por meio das duas metodologias, foi verificada a presença de bactérias nas amostras de água do chuveiro disponibilizado por barraqueiros, na altura do posto 12 na praia do Leblon, e nas amostras coletadas em outro chuveiro de barraqueiro na altura do posto três da praia do Flamengo. Ambas as amostras foram coletadas e enviadas no mesmo dia para a análise do material.

A fim de confirmar esses resultados positivos identificados, foi realizada uma nova coleta dessas amostras, nos mesmos locais de coleta no dia sete de dezembro de 2017 e, um novo processamento das amostras 1 e 2, mantendo suas duplicatas (amostra 1/d e amostra 2/d). Dessa forma, realizou-se novamente o mesmo processamento, para ambas as amostras, porém com novos frascos estéreis, lacrados de forma a não permitir a contaminação durante o transporte para o laboratório.

A data, horário e local das novas coletas e os resultados obtidos no novo processamento de amostras seguem respectivamente, nas tabelas abaixo:

Quadro 7: Data, horário e local de coleta das amostras para confirmação da hipótese de contaminação.

AMOSTRAS	DATA	HORÁRIO	LOCAL
1 e 1/d	07/12/2017	08h30min	chuveiro na praia do Leblon, Posto 12, na altura da rua João Lira, Rio de Janeiro, RJ.
2 e 2/d	07/12/2017	09h15min	chuveiro na praia do Flamengo, Posto 3, Rio de Janeiro, RJ.

Quadro 8: resultados obtidos após o processamento das amostras para confirmação da hipótese de contaminação.

AMOSTRAS	MÉTODO DO SUBSTRATO	MEMBRANA FILTRANTE 24 HORAS	MEMBRANA FILTRANTE 48 HORAS
Amostra 1 e amostra 1/duplicata	Negativo	Não houve crescimento.	Não houve crescimento.
Amostra 2 e amostra 2/duplicata	Negativo	Não houve crescimento	Não houve crescimento.

Deste modo os resultados obtidos confirmam a hipótese de contaminação dos frascos durante o transporte para o laboratório, obtendo leitura negativa nas duas técnicas realizadas

após o período de incubação indicado, diferentemente da primeira leva de amostras coletadas que se contaminaram no transporte.

7 DISCUSSÃO

De acordo com nossos resultados, ambas as metodologias escolhidas para este projeto foram efetivas em possibilitar a qualificação da água dos chuveiros como contaminada ou não por coliformes totais ou fecais, especialmente *Escherichia coli*. Esses achados, corroboram com Lima e colaboradores (2001), que usaram ambas as técnicas para estudo destes micro-organismos em águas naturais e em esgoto bruto e tratado, não encontrando diferenças significativas.

Apesar de termos conseguido isolar bactérias em ambas as técnicas no material proveniente das coletas 1 e 2, a detecção do mesmo micro-organismo em diferentes praias, suscitou dúvidas quanto a esterilidade dos frascos utilizados, já que não haviam sido autoclavados pelos participantes da pesquisa, pois foram disponibilizados pelo departamento onde se realizou a execução de uma das técnicas de identificação. Esse ocorrido induzi-nos a confirmar esses resultados com uma segunda coleta nos mesmos chuveiros, utilizando então material esterilizado pelo próprio autor. Essa coleta resultou então em negatividade no crescimento tanto de coliformes totais como fecais nos dois pontos que inicialmente apontaram crescimento. A importância da garantia da boa esterilização é apontada por Neves e colaboradores (2004) que realizaram um estudo em materiais esterilizados por calor úmido, mesma técnica que utilizamos em nossa pesquisa.

As análises microbiológicas realizadas, revelaram a ausência de coliformes totais ou fecais nas amostras de água dos chuveiros utilizados nas análises, o que demonstra que a água está de acordo com os padrões estabelecidos pela Portaria 36 de 1990, do Ministério da Saúde. Pesquisas que utilizam a água dos chuveiros como parâmetro para verificação do grupo coliforme não são facilmente encontrados, impedindo uma comparação mais direta dos resultados em todos os pontos coletados.

Na ocasião em que houve a presença de contaminantes no material utilizado para a coleta, ambas as técnicas evidenciam a presença ou a ausência do grupo coliforme, o que indicou a possibilidade de uso de qualquer uma das técnicas para essa detecção. Todavia, a técnica da membrana evidenciou a presença de micro-organismos 24 horas antes da técnica cromogênica, o que significa que apesar de ser um pouco mais trabalhosa, é mais sensível.

Por outro lado, a verificação da presença de coliformes totais e fecais já foi realizada em estudos com águas que deveriam ser potáveis, em sua maioria, com resultados positivos para o grupo dos coliformes. Em minoria, um dos estudos com resultados negativos é de 2001,

por Gomes et al, onde foram analisadas as amostras de água de bebedouros de um Instituto, no sul de Minas. Onde maioria dos estudos comprovam o contrário, como o realizado por Oliveira e Terra, 2004, verificaram resultados positivos para coliformes totais e fecais na água de bebedouros, no campus da Faculdade de Medicina do triângulo Mineiro, destacando que todas as amostras coletadas estavam contaminadas. Carloni e colaboradores (2014), recentemente, realizaram o monitoramento da água dos chuveiros de Ipanema e Leblon, totalizando dezoito coletas onde verificaram a presença de coliformes totais na maioria dos dias de coleta de ambas as praias.

O Poder Público, entretanto, pode instituir regulamentações aos barraqueiros para que a utilização dos chuveiros disponibilizados por eles não seja um parâmetro de risco para a Saúde Pública. Deve haver fiscalização e toda informação necessária deve ser exposta ao usuário do chuveiro para que o mesmo esteja ciente de que há regulamentação e avaliação de qualidade da água que disponibilizam para o seu lazer e higiene.

Os resultados obtidos neste trabalho qualificam, estritamente, a água dos chuveiros coletadas como apropriada com relação a presença de coliformes totais e ou fecais. Entretanto, outros aspectos da água devem ser analisados para que a mesma seja considerada apropriada para a utilização do público. Aspectos químicos, como salinidade, PH, fosfato e alcalinidade devem ser levados em consideração para que os banhistas não estejam expostos a nenhum risco de infecção. (MS, 2006)

8 CONCLUSÃO

No período de julho de 2017 e novembro de 2017, foram feitas coletas da água de chuveiros disponibilizados por barraqueiros, em quatro praias da cidade do Rio de Janeiro e, por conseguinte, com duas análises microbiológicas buscou-se identificar quantitativamente e qualitativamente a presença de coliformes fecais nessas águas.

O grupo dos coliformes totais engloba os principais patógenos causadores de doenças transmitidas pela água, dentre eles, o grupo dos coliformes fecais. Os coliformes fecais possuem maior incidência quando se aborda a poluição da água, pois estão presentes nos esgotos não tratados, sendo essa a maior fonte não pontual de contaminação da água. Dentro do subgrupo de coliformes fecais, o patógeno mais frequente é a *Escherichia coli.*, sendo também o principal indicador de poluição fecal.

A contaminação fecal da água é um fator de risco não só para o meio ambiente, mas também para a saúde de quem está exposto a essa contaminação. A falta de saneamento básico, falta de investimento do poder público em estações de tratamento de esgoto e falta do controle de qualidade da água que chega até os banhistas, contribuem para que as doenças de veiculação hídrica sejam mais frequentes.

As análises microbiológicas realizadas no presente estudo contribuem para elucidar sobre a condição de potabilidade da água, para que riscos à infecções por coliformes sejam evitados.

A partir das metodologias da técnica de membrana filtrante e do método do substrato cromogênico, foi possível diagnosticar a presença ou a ausência de coliformes totais e fecais na água dos chuveiros cariocas.

A partir das análises das amostras coletadas, foi possível identificação qualitativa e a identificação quantitativa de coliformes, em diferentes pontos das praias da cidade do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos na pesquisa foram negativos em todos os pontos de coleta para detecção do grupo de coliformes, tanto totais como fecais.

Esses resultados estabelecem que a água dos chuveiros analisados no presente estudo, cumpre com os padrões estabelecidos pela portaria 36 de 1990. Entretanto, há necessidade de um estudo maior com amostragem ampliada para definir que os limites para coliformes

encontrados nas águas as tornam adequadas para o uso dos banhistas, já que os resultados encontrados para o grupo dos coliformes é negativo.

Deve-se levar em consideração a dimensão que os chuveiros de barraqueiros, disponíveis nas praias possuem, ao avaliar os resultados. A água dos chuveiros utilizados obtém avaliação positiva. Entretanto, não se pode afirmar que a água de todos os chuveiros disponíveis nas praias do Rio de Janeiro possuirá a mesma avaliação ao serem analisadas, pois a falta de regulamentação dos chuveiros disponibilizados pelos barraqueiros contribui para que a fiscalização não se torne frequente e obrigatória para a segurança dos usuários das praias.

Os resultados obtidos possuem não só uma avaliação satisfatória, mas comprovam que, estritamente a água dos chuveiros analisados não é potencialmente infecciosa para os usuários. As análises avaliam somente a presença do grupo coliforme, não sendo parâmetro para outros aspectos que classificam a qualidade da água.

Após obter os resultados, a técnica da membrana evidenciou a presença de micro-organismos 24 horas antes da técnica cromogênica, o que significa que apesar de ser um pouco mais trabalhosa, permitiu a evidenciação mais rápida da positividade no crescimento. Outra vantagem é que ao contrário do método do substrato cromogênico, a técnica da membrana permitiu isolar e evidenciar as diferentes bactérias presentes por diferença colonial. O método cromogênico apenas indica positividade ou negatividade, o que acaba por restringir o resultado à detecção de coliformes totais e a presença de *E. coli*, já que, quando negativo para esses grupos não se tem qualquer outro parâmetro. Em contrapartida, a técnica de membrana filtrante, pois como esta possui perfil mais amplo, é capaz de diagnosticar a presença dos coliformes, mas também de outras bactérias que não pertencem a esse grupo e são também potencialmente patogênicas para a saúde. Portanto, mostrou-se mais sensível para detecção de micro-organismos patogênicos na água a técnica da membrana filtrante.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALERJ. Rio de Janeiro. Lei Nº 109/2015, de 27 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre a instalação de chuveiros, pela CEDAE, nas praias do estado do Rio de Janeiro e dá outras providências.

ALMEIDA, R. M. A. A. et al. Qualidade microbiológica do córrego “Ribeirão dos Porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal-SP. Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal, v. 1, n. 1, p. 051-056.2004, 2004.

BETTEGA, J. M. P. R. et al. Métodos Analíticos no controle microbiológico de água para consumo humano. Cienc. agrotec. vol.30. 2006,

BRASIL. PORTARIA Nº 36/MS/GM, DE 19 DE JANEIRO DE 1990. 1990

BRITO, C. Poder Público vai discutir chuveiros das praias da Zona Sul. O Globo. 2012. Disponível em: < <https://oglobo.globo.com/rio/bairros/exame-comprova-contaminacao-da-agua-de-chuveirinhos-de-praias-da-zona-sul-3985142> > Acesso em 27 de outubro de 2017.

CARDOSO. A.L.S.P. Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado. v.68, n.1, p.19-22. 2001.

CARLONI, I. L. B. S. A. C. Monitoramento da água da água dos chuveiros de Ipanema e Leblon. PUC- Rio. 2014.

FERNANDES. L. L, GOIS. R. V. Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltadas para a detecção de coliformes totais e termotolerantes. Revista Científica da Faculdade de educação e Meio Ambiente 6(2): 49-64. 2015.

FRAZÃO. A. Escherichia coli. Tua saúde. 2016. Disponível em < <https://www.tuasaude.com/escherichia-coli/> > Acesso em 28 de novembro de 2017

FREITAS, M. B. et al. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(3):651-660, mai-jun. 2001.

GODOI, Isamara et al. Indicadores microbiológicos da água e solo. 2014

GUERRA et al., 2006 - 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.*, v.28, n.1, p.13-18, 2006.

HORTA. S. P. D. A importância da água, Web artigos. 2009.

LECHAVALIER, WELCH, SMITH. Estudos em escala completa de fatores relacionados ao rebrote coliforme na água potável. *Appl Environ Microbiol.* 1996.

LIMA. A. M, et al. Estudo comparativo entre as técnicas de determinação de coliformes fecais e *Escherichia coli* em águas naturais e residuárias utilizando os métodos da membrana filtrante e do substrato cromogênico. In: Saneamento ambiental: desafio para século. ABES, P. 1-9, 2001.

MERGULHÃO, A. C.. E. Esgoto despejado na Baía de Guanabara encheria 185 piscinas olímpicas. 2015. <<https://extra.globo.com/noticias/rio/esgoto-despejado-todo-dia-na-baia-de-guanabara-encheria-185-piscinas-olimpicas-17193820.html>> Acesso em: 03 de outubro de 2017.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

MIRANDA, A. T. Uol educação, pesquisa escolar. Metrôpoles: impactos ambientais da educação.2008. Disponível em <https://educacao.uol.com.br/disciplinas/geografia/metropoles-impactos-ambientais-da-urbanizacao.htm>> Acesso em 10 de novembro de 2017.

MOURA, ASSUMPÇÃO, BISCHOFF, 2009 - MOURA, A. C., ASSUMPÇÃO, R. A. B, BISCHOFF, J. Monitoramento físicoquímico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. *Arq. Inst. Biol.*, v.76, n.1, p.17-22, 2009.

NEVES. P, et al. Artigos estelizados em calor úmido: validação do sistema de armazenamento. *Revista brasileira de Enfermagem.* 2004. Disponível em: <<http://www.uacm.kirj.redalyc.org/articulo.oa?id=267019637004>> . Acesso 20 de dezembro de 2017.

NOGUEIRA, J.M.R.; SOUZA MIGUEL, L.F. Bacteriologia. cap 3 IN: Conceitos e Métodos para formação de profissionais em Laboratório de Saúde. EPSJV/FIOCRUZ. 2010.

OLIVEIRA. A. C. S., Terra A. P. S. Avaliação Microbiológica das águas de bebedouros do campus I da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à presença de coliformes totais e fecais. Revista Higiene Alimentar. Vol 18. Nº 125. Pg 57-63. 2004.

OLIVEIRA. M. Poluição da água, trabalhos gratuitos. 2013.

REDONDO. A. A. G. Urbe Carioca, o Rio de Janeiro à beira d'água. 2015.

SALEMI. L. F. Fontes de poluição: pontual ou não pontual?. 2015.

SILVA et al., 2005 - SILVA, N; NETO, R.C.; JUNQUEIRA A.C.V.; SILVEIRA, A.F.N. Manual de métodos de análise microbiológica da água. São Paulo: Varela, 2005. 13,21,22,24,27,29,30,35,36,41,67,69p.

VALENTE. M. S. Manual prático de análise da água. p.29-38. FUNASA, 2013.

ZIESE et al., 1996 - ZIESE, T., ANDERSON, Y., JONG, B., LOFDHAL, S., RAMBERG M. Surto de Escherichia coli O157 na Suécia. Relatório de investigação de surtos., v.1, n.1, 1996. 10p.