

Finalidade da Solicitacao: PARECER TÉCNICO FLORESTAL PARA DESDOBRAMENTO DE LOTE
Município: JUNDIAÍ
Processo/ano: 02520/08
Data: 27/02/2008
Nome do Interessado: MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DE SÃO PAULO - 2.ª PROMOTORIA DE INDAIATUBA
Finalidade da Solicitacao: Ainda sem IC - TCO nº 080660 - Tarciso Maschietto - ofício nº 117/07 - não há informações sobre nº de auto lavrado - Solicita vistoria na Rod SP 75 - Km 31 (Cerâmica Tebas) que aponte a extensão dos danos e forma de recuperação visando elaboração de TAC
Município: INDAIATUBA
Processo/ano: 02574/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: ORLANDO BIGUZZI E OUTROS
Finalidade da Solicitacao: PARECER TÉCNICO FLORESTAL PARA DESDOBRAMENTO DE LOTE
Município: CABREÚVA
Processo/ano: 02577/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: PODER JUDICIÁRIO DE SÃO PAULO - 5.ª VARA CÍVEL COMARCA DE JUNDIAÍ
Finalidade da Solicitacao: Processo 0272/08 - Ofício nº 0239/08 - contra Roberto Gomes Vidal e Secretaria do Meio Ambiente - Solicita cópia do PSMA que resultou na autorização de corte da vegetação na Estrada do Rio Acima, Pinheirinho nº 280 - Bairro Rio Acima, de propriedade de Roberto Gomes Vidal
Município: JUNDIAÍ
Processo/ano: 02587/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: ATHAIDE CIDNEI DE CARVALHO E OUTROS
Finalidade da Solicitacao: PARECER TÉCNICO FLORESTAL PARA DESDOBRAMENTO DE LOTE
Município: CABREÚVA
Processo/ano: 02588/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: ADAIR BARBOSA DE OLIVEIRA HION E OUTRO
Finalidade da Solicitacao: PARECER TÉCNICO FLORESTAL PARA DESDOBRAMENTO DE LOTE
Município: CABREÚVA
Processo/ano: 02591/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: JOY ADMINISTRAÇÃO PARTICIPAÇÕES IMOBILIÁRIAS LTDA
Finalidade da Solicitacao: PTF para implantação de Vila Residencial Autorização para movimentação de solo acima de 100 m²-LOTE B3
Município: JUNDIAÍ
Processo/ano: 02592/08
Data: 28/02/2008
Nome do Interessado: JOY ADMINISTRAÇÃO PARTICIPAÇÕES IMOBILIÁRIAS LTDA
Finalidade da Solicitacao: PTF para implantação de Vila Residencial Autorização para movimentação de solo acima de 100 m²-LOTE B2
Município: JUNDIAÍ
Processo/ano: 02625/08
Data: 29/02/2008
Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE INDAIATUBA
Finalidade da Solicitacao: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA VIÁRIO E TRAVESSIA
Município: INDAIATUBA
Processo/ano: 02652/08
Data: 29/02/2008
Nome do Interessado: ANTONIO CARLOS DE ALMEIDA QUITELA E OUTRO
Finalidade da Solicitacao: PROTOCOLO N.º 8958 - "LOTEAMENTO JARDIM SANTA MARTA IV"
Município: SALTO
Processo/ano: 2665/08
Data: 29/02/2008
Nome do Interessado: JOÃO SEVERINO ROSA E ESPOSA
Finalidade da Solicitacao: PARECER TÉCNICO FLORESTAL PARA FRAÇIONAMENTO DE LOTE
Município: JUNDIAÍ
Processo/ano: 2666/08
Data: 29/02/2008
Nome do Interessado: ÁGUAS DE CAJAMAR
Finalidade da Solicitacao: CONSULTA SOBRE A DOMINIALIDADE EM FAVOR DE PREFEITURA MUNICIPAL DE CAJAMAR
Município: CAJAMAR
O Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais para dar cumprimento a Resolução SMA 66/96, faz publicar a relação de autorizações e indeferimentos concedidos pela Regional Centro Paulista
Regional: DPRN-1 Mes/Ano: Janeiro 2008
Equipe Técnica: Jundiaí
Processo/ano: 65876/2007
Nome do Interessado: DELTA MONTAGENS INDUSTRIAIS LTDA
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 12,728016
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE TERRA EM APA PARA EDIFICAÇÃO DE GALPÃO INDUSTRIAL
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65777/2007
Nome do Interessado: PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE JUNDIAÍ
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 1,751328
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA DESASSOREAMENTO DO TRECHO Córrego PONTE ALTA
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66086/2007
Nome do Interessado: WEIR DO BRASIL LTDA
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 3,141813
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO EM APA PARA CONSTRUÇÃO DE GALPÃO INDUSTRIAL
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66097/2007
Nome do Interessado: GWI EMPREENDIMENTOS IMOBILIÁRIOS S/A
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 9,874123
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO EM APA PARA CONSTRUÇÃO DE GALPÃO
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66091/2007
Nome do Interessado: CREDI-NINO COMÉRCIO DE MÓVEIS TDA
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 0,500000

Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO EM APA PARA CONSTRUÇÃO DE GALPÃO COMERCIAL
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 252/2008
Nome do Interessado: JOSÉ VALMIRO PAVAN E OUTROS
Município: JUNDIAÍ
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA CORTE DE 05 (CINCO) ÁRVORES NATIVAS ISOLADAS COM RISCO DE QUEDA
Processo/ano: 65787/2007
Nome do Interessado: RESIN ADMINISTRAÇÃO E COMÉRCIO LTDA
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 0,213000
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO EM APA PARA CONSTRUÇÃO DE EDIFÍCIO COMERCIAL
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65977/2006
Nome do Interessado: ESPÓLIO DE ELIAS ANTONIO SUCAR
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 0,20853
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA CORTE DE 27 (VINTE E SETE) ÁRVORES NATIVAS ISOLADAS AUTORIZAÇÃO PARA O CORTE DE VEGETAÇÃO SECUNDÁRIA EM ESTÁGIO INICIAL DE REGENERAÇÃO EM UMA ÁREA CORRESPONDENTE A 0,020853 ha
Tipo da Vegetação: FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL (TROPICAL SUBCADUCIFÓLIA)
Estágio Sucessional: ESTÁGIO SECUNDÁRIO INICIAL
Processo/ano: 65651/2007
Nome do Interessado: PLESFORD DO BRASIL PARTICIPAÇÕES LTDA
Município: CABREÚVA
Área autorizada (ha): 0,811653
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO PARA CONSTRUÇÃO DE GALPÃO INDUSTRIAL
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66023/2007
Nome do Interessado: SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTOS - SAAE
Município: INDAIATUBA
Área autorizada (ha): 2,500000
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA IMPLANTAÇÃO DE INTERCEPTOR DE ESGOTO NA MARGEM DO RIO JUNDIAÍ
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA E FLORESTAL ESTACIONAL SEMIDECIDUAL (TROPICAL SUBCADUCIFÓLIA)
Estágio Sucessional: ESTÁGIO SECUNDÁRIO MÉDIO
Processo/ano: 66038/2007
Nome do Interessado: COMERCIAL FLORESTAL LTDA
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 0,751066
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA CORTE DE 04 (QUATRO) ÁRVORES ISOLADAS NATIVAS E AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE TERRA EM APA
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66032/2007
Nome do Interessado: MAURICIO SPIMPOLO E OUTROS
Município: CABREÚVA
Área indeferida (ha): 5,1829
Finalidade da solicitação: AVERBAÇÃO DE ÁREA VERDE EM ÁREA URBANA
Tipo da Vegetação:
Estágio Sucessional:
Processo/ano: 65888/2007
Nome do Interessado: KRAFT FOODS BRASIL E AB BRASIL INDUSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA
Município: JUNDIAÍ
Área indeferida (ha): 1,540789
Finalidade da solicitação: DESCARACTERIZAÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE
Tipo da Vegetação:
Estágio Sucessional:
O Departamento Estadual de Proteção de Recursos Naturais para dar cumprimento a Resolução SMA 66/96, faz publicar a relação de autorizações e indeferimentos concedidos pela Regional Centro Paulista
Regional: DPRN-1 Mes/Ano: Fevereiro 2008
Equipe Técnica: Jundiaí
Processo/ano: 65987/2007
Nome do Interessado: NATÁLIA PRIOR GASIOLA
Município: INDAIATUBA
Área autorizada (ha): 0,025500
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA O CORTE DE 40 ÁRVORES NATIVAS ISOLADAS E INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA IMPLANTAÇÃO DE TUBULAÇÃO DE COLETA DE ESGOTO E ESTRUTURAL DE DISSIPAÇÃO DE ENERGIA HÍDRICA EM FINAL DE GALERIA PARA O ESCOAMENTO DE ÁGUAS PLUVIAIS DO LOTEAMENTO RESIDENCIAL
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65961/2007
Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE INDAIATUBA
Município: INDAIATUBA
Área autorizada (ha): 0,59400
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA SUPRESSÃO DE VEGETAÇÃO SECUNDÁRIA EM ESTÁGIO MÉDIO DE REGENERAÇÃO PARA ADEQUAÇÃO TOPOGRÁFICA COM A FINALIDADE DE IMPLANTAÇÃO DE REDE COLETORES DE ESGOTO
Tipo da Vegetação: FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL (TROPICAL SUBCADUCIFÓLIA)
Estágio Sucessional: ESTÁGIO SECUNDÁRIO MÉDIO
Processo/ano: 65769/2007
Nome do Interessado: GILBERTO APARECIDO GARCIA E OUTRA
Município: JARINU
Área autorizada (ha): 0,682072
Finalidade da solicitação: SUPRESSÃO DE VEGETAÇÃO SECUNDÁRIA EM ESTÁGIO INICIAL DE REGENERAÇÃO PARA OBRAS DE DE INFRA-ESTRUTURA E MELHORIAS
Tipo da Vegetação: FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL (TROPICAL SUBCADUCIFÓLIA)
Estágio Sucessional: ESTÁGIO SECUNDÁRIO INICIAL
Processo/ano: 65699/2006
Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE JUNDIAÍ
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 1,816502
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA CANALIZAÇÃO ABERTA EM CANAL TRAPEZOIDAL DE CONCRETO DO RIO JUNDIAÍ À JUSANTE DA AVENIDA NOVE DE JULHO (TRECHO AVENIDA NOVE DE JULHO/RUA MARIA DO CARMO PONTES DE OLIVEIRA)
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65912/2006
Nome do Interessado: ADEMIR ANDRÉ COSTA E OUTROS
Município: JUNDIAÍ

Área autorizada (ha): 0,0583700
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA EXECUÇÃO DE OBRAS PARA REGULARIZAÇÃO DE RECURSOS HÍDRICOS
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65990/2006
Nome do Interessado: CBC INDÚSTRIAS PESADAS S/A
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 1,822478
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA MOVIMENTAÇÃO DE SOLO ACIMA DE 100M³ PARA ACESSO INTERNO
Tipo da Vegetação: SEM VEGETAÇÃO
Estágio Sucessional: SEM VEGETAÇÃO
Processo/ano: 66060/2007
Nome do Interessado: ASSOCIAÇÃO DOS AMIGOS DO PORTAL DO PARAÍSO - 2.ª FASE
Município: JUNDIAÍ
Área indeferida (ha): 0,059081
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA SUPRESSÃO DE VEGETAÇÃO NATIVA
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO NATIVA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO INICIAL
Processo/ano: 65938/2007
Nome do Interessado: MOREIRA CUNHA RESTAURANTES LTDA EPP
Município: JUNDIAÍ
Área indeferida (ha): 0,021360
Finalidade da solicitação: INTERVENÇÃO EM APP PARA CONSTRUÇÃO DE RESTAURANTE
Tipo da Vegetação: EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 67760/2004
Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE VÁRZEA PAULISTA
Município: VÁRZEA PAULISTA
Área autorizada (ha): 0,166593
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA ADEQUAÇÃO VIÁRIA (CONSTRUÇÃO DE UM ACOSTAMENTO/ÁREA DE ESCAPE JUNTO A AVENIDA MARGINAL)
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66040/2007
Nome do Interessado: PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE JUNDIAÍ
Município: JUNDIAÍ
Área autorizada (ha): 5,599107
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA OBRAS DE DESASSOREAMENTO DO RIO JUNDIAÍ NO TRECHO ENTRE A RODOVIA ANHANGUERA E A AVENIDA DANIEL PELLIZZARI.
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 65913/2006

Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO LIMPO PAULISTA
Município: CAMPO LIMPO PAULISTA
Área autorizada (ha): 0,50800
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA SUBSTITUIÇÃO DE GALERIA SOB SISTEMA VIÁRIO
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO
Processo/ano: 66029/2007
Nome do Interessado: PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO LIMPO PAULISTA
Município: CAMPO LIMPO PAULISTA
Área autorizada (ha): 0,760000
Finalidade da solicitação: AUTORIZAÇÃO PARA INTERVENÇÃO EM ÁREA DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE PARA DESASSOREAMENTO DOS SEGUINTES Córregos: JARDIM SANTA MARIA, EGUAS, SÃO JOSÉ E SANTO ANTONIO. NOS TRECHOS CONFORME PLANTA QUE ACOMPANHA O PRESENTE DOCUMENTO.
Tipo da Vegetação: VEGETAÇÃO EXÓTICA
Estágio Sucessional: ESTÁGIO PIONEIRO

UNIDADE DE COORDENAÇÃO DO PROJETO DE RECUPERAÇÃO DE MATAS CILIARES

Despachos da Gerente Executiva De 5-3-2008
Adjudicando, na forma prevista nas Diretrizes para Contratação de Consultores pelos Mutuários do Banco Mundial, de maio de 2004 e no Acordo de Doação TF055091, firmado entre o Estado de São Paulo e o Banco Mundial e nos termos facultados pelo Parágrafo 5º do Artigo 42 da Lei Federal 8.666/93, à Auris Produções e Comunicações Ltda, o contrato para produções e comunicações do programa de rádio - Sintonia Verde para o Projeto de Recuperação de Matas Ciliares, no valor total de R\$ 129.567,83. Processo SMA 5.360/2007. Parecer CJ 91/2008.

De 14-3-2008
Adjudicando, nos termos previstos no Acordo de Doação GEF nº TF 055091, firmado com o Banco Mundial, considerando as normas estabelecidas nas "Diretrizes para Aquisições no Âmbito de Empréstimos do BIRD e Créditos da AID", de maio/2004, daquela instituição e conforme facultado pelo Parágrafo 5º do Artigo 42 da Lei Federal 8.666/93, a contratação de serviços de fornecimento de coffee break e brunch para o Seminário Mata Ciliar - Instrumentos para o Programa Estadual de Recuperação de matas Ciliares - Biomonitoramento e Educação Ambiental, objeto da Comparação de Preços - Shopping nº 003/2008/UCPRMC - Processo SMA 260112-000.000.000.021/2008, no âmbito do Projeto de Recuperação de Matas Ciliares, na seguinte conformidade:
Empresa/Item/Descrição/Valor Total
Buffet Mendes Moreira Ltda/ Item 01 / Coffee Break/Brunch / R\$ 2.870,00.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

DECISÃO DE DIRETORIA Nº 203/2007/P, de 07.11.2007

Dispõe sobre a homologação da revisão da Norma Técnica L5.214 – Coliformes Totais – Determinação pela Técnica de Membrana Filtrante – Método de Ensaio - agosto/2007 - e dá outras providências.

A Diretoria Plena da CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, à vista de tudo quanto consta do Processo nº STA 485/84 e considerando o contido no Relatório à Diretoria nº 044/2007/P, que acolhe, decide:

Artigo 1º: Homologar a revisão da Norma Técnica L5.214 – Coliformes Totais – Determinação pela Técnica de Membrana Filtrante – Método de Ensaio - ago/2007, constante do Anexo Único que integra esta Decisão de Diretoria.

Artigo 2º Esta Decisão de Diretoria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se a Decisão de Diretoria da CETESB nº 075/92/P/N, de 23 de julho de 1992, que aprovou a versão de maio/1992 da referida norma.

ANEXO ÚNICO A QUE SE REFERE O ARTIGO 1º DA DECISÃO DE DIRETORIA Nº 203/2007/P, DE 07 - 11 - 2007.

NORMA TÉCNICA L5.214 (Versão Agosto/2007)

L5.214 – Coliformes Totais – Determinação pela Técnica de Membrana Filtrante – Método de Ensaio

SUMÁRIO

Introdução

- 1 **Objetivo**
- 2 **Documentos Complementares**
- 3 **Definições**
- 4 **Aparelhagem**
- 5 **Meios de culturas e soluções**
- 6 **Execução de ensaio**
- 7 **Resultados**
- 8 **Testes complementares para confirmação de coliformes totais**
- 9 **Referências**

Introdução

A poluição das águas por material fecal de origem humana e animal torna esse elemento um veículo de transmissão de doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Devido ao seu elevado potencial de disseminação, essas doenças representam um importante risco à saúde humana, e são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004).

A detecção de microrganismos patogênicos, embora necessária em algumas circunstâncias, não é aplicável para fins de monitoramento ou verificação de rotina. Por esse motivo, uma das estratégias mais viáveis para o controle da qualidade microbiológica da água é a avaliação da presença dos chamados microrganismos indicadores de contaminação fecal. Esses microrganismos devem possuir uma série de características, dentre elas, estar presente em grande quantidade em fezes humanas e de animais de sangue quente, não se multiplicar em águas naturais e ser detectável por métodos laboratoriais simples e rápidos.

Alguns microrganismos atendem à maior parte desses requisitos, destacando-se dentre eles as bactérias do grupo coliforme. Tratam-se de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, e sua definição não se baseia unicamente em critérios taxonômicos, mas inclui igualmente várias características observadas nos métodos analíticos utilizados para sua detecção. Assim, as bactérias do grupo coliforme são definidas como bacilos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de crescer na presença de concentrações relativamente elevadas de sais biliares e fermentar a lactose na temperatura de 35 - 37°C, com formação de ácido, gás e aldeído, em 24 a 48 horas. A *Escherichia coli* e os coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais que podem fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004, STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS 2002). Mais recentemente, foram incluídos critérios adicionais para caracterização de uma bactéria como pertencente ao grupo coliforme, dentre eles a expressão da atividade da β-D-galactosidase, uma das enzimas responsáveis pela fermentação da lactose (LECLERC 2001).

Além da origem fecal, várias bactérias do grupo dos coliformes totais são exclusivamente ambientais e podem multiplicar-se na água e em biofilmes. Por esse motivo, elas não são atualmente utilizadas como indicadoras de contaminação fecal, mas sim para avaliação da eficiência do tratamento, da limpeza e integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004, STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS 2002).

A *Escherichia coli* é a única bactéria do grupo dos coliformes totais cujo habitat exclusivo é o trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente, sendo geralmente a bactéria predominante do subgrupo dos coliformes termotolerantes. Por esse motivo, a *E. coli* é considerada o indicador ideal de contaminação fecal, mas são igualmente aceitáveis para esse fim os coliformes termotolerantes (LECLERC 2000, WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004).

Em concordância com esses conceitos, a legislação brasileira sobre qualidade de águas destinadas ao consumo humano, águas minerais e águas naturais determina que sejam analisados os coliformes termotolerantes ou, preferencialmente, a *E. coli*, que devem estar ausentes nessas águas. Quanto aos coliformes totais, é exigida ausência na água tratada, na saída do sistema, sendo aceitas determinadas porcentagens na rede de distribuição, enquanto que para águas minerais e águas naturais, é estabelecido um limite máximo para essas bactérias. (BRASIL 2004, BRASIL 2005).

A técnica de membrana filtrante é um dos métodos que pode ser utilizado para a quantificação de coliformes em águas. É uma técnica muito reprodutível, pode ser utilizada para grandes volumes de água e, em geral, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente em comparação com a técnica de tubos múltiplos. É bastante útil no monitoramento da água de consumo humano e outras águas naturais, mas apresenta algumas limitações, quando a água possui turbidez elevada ou altas concentrações de bactérias não pertencentes ao grupo dos coliformes (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

A presente norma apresenta a determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, pela técnica de membrana filtrante, segundo o método descrito no "Standard Methods" (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

1 Objetivo

Esta Norma prescreve a técnica da membrana filtrante para a determinação da densidade de bactérias do grupo coliforme, com aplicação na:

- Avaliação da qualidade de águas tratadas ou brutas destinadas ao consumo humano (com ou sem simples desinfecção);
- Avaliação e controle de qualidade de mananciais que abastecem estações de tratamento de água;
- Avaliação e controle das águas destinadas à recreação de contato primário;
- Avaliação da qualidade de águas minerais;
- Avaliação e controle de águas destinadas à criação natural intensiva ou ambas (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana;
- Detecção de contaminação fecal.

2 Documentos Complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para esta norma. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita à revisão e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma é necessário consultar:

- CETESB (São Paulo). Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988;
- L5.216 – Controle de Qualidade de Meios de Cultura.
- M1.001 – Lavagem, Preparo e Esterilização de Materiais em Laboratórios de Microbiologia.

3 Definições

Para os efeitos desta norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.7.

3.1 Coliformes totais

Grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, capazes de crescer na presença de sais de bile ou outros agentes de superfície com propriedades seletivas similares e que possuem a enzima β-galactosidase. Fermentam a lactose a 35-37°C com produção de ácido, gás e aldeído em 24-48 horas. São capazes de utilizar substratos cromogênicos contendo β-galactosídeo na temperatura de 35-37°C.

3.2 Coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44-45°C em 24 horas.

3.3 *Escherichia coli*

Principal bactéria do subgrupo dos coliformes termotolerantes, sendo de origem exclusivamente fecal. Dentre os coliformes, *E. coli* é a única bactéria que possui a enzima β-D glucuronidase, requerida para a hidrólise do MUG.

3.4 MUG (4 metilumbeliferil β-D glicuronídeo)

Substrato para a enzima β-D glicuronidase, enzima presente em 95% das linhagens de *E. coli*. Esse substrato é utilizado no meio EC-MUG para diferenciação de *E. coli* dos outros termotolerantes.

3.5 Bacilo

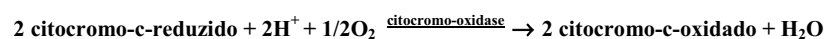
Designação dada a bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.6 Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta. As bactérias, nas quais o cristal-violeta é retido, apresentam coloração roxa (Gram-positivas), e aquelas nas quais o cristal-violeta é removido pela ação do álcool-acetona, coram-se posteriormente pela safranina, apresentando coloração rosa (Gram-negativas).

3.7 Teste de oxidase

Este teste tem por finalidade evidenciar a presença da citocromo-oxidase, uma enzima da cadeia respiratória de certas bactérias. Esta enzima é necessária para a oxidação do citocromo c, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo-c-oxidado, sofre redução, ocorrendo a oxidação da tetrametil-p-fenilenodiamina, formando-se uma substância de coloração azul. As bactérias do grupo coliforme, por não possuírem a citocromo-c-oxidase, apresentam resultado negativo neste teste.

4 Aparelhagem

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g. As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura.

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme na faixa requerida (44,5 ± 0,2°C) em todos os pontos. O termômetro utilizado para controle do banho-maria deve ter a escala graduada em incrementos de 0,2°C ou menos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para atingir a altura do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio imersos para incubação.

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana no Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water (UNITED STATES EPA, 2005).

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.¹

4.1.4.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura de 170 a 180°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

4.1.5 Equipamentos para filtração

4.1.5.1 Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5atm.

4.1.5.2 Frasco Kitassato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada, ou

¹ As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizando, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

suporte para os porta-filtros, individual ou múltiplo ("manifold").

4.1.5.3 Frasco para proteção, com capacidade adequada, conectado ao frasco de filtração (ou ao suporte) e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou de látex de espessura adequada.

4.1.5.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável, para membranas de 47mm de diâmetro (Figura 1).

4.1.6 Incubadora bacteriológica

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida (35 ± 0,5°C ou 44,5 ± 0,2°C). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a escala graduada em incrementos de 0,5°C ou menos, para a faixa de temperatura de 35 ± 0,5°C e de 0,2°C ou menos, para a faixa de temperatura de 44,5 ± 0,2°C, e estar imerso em água.²

4.1.7 Microscópio estereoscópio binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros. Para iluminação, usar lâmpada de luz fluorescente branca (fria).

4.1.8 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH.

4.1.9 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, e ter capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de 1°C ou menos.

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Balões

De borossilicato, vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade adequada para conter a água de diluição a ser usada no enxágüe dos porta-filtros, durante a filtração das amostras.

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125mL, com boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.3 Provetas³

Graduadas (100mL) com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4 Tubos de ensaio

2 Para atender ao rígido controle de temperatura requerido nas determinações de coliformes termotolerantes deve-se utilizar um banho-maria ou incubadora que comprovadamente proporcione esse controle.

3 Em alternativa às provetas, podem ser utilizados porta-filtros graduados, com erro volumétrico inferior a 2,5%

De borossilicato ou vidro neutro de 15mm de diâmetro x 150mm de comprimento (com tampa de rosca de material atóxico), de 15 ou 16mm de diâmetro x 150mm de comprimento (com tampas frouxas) e de 12mm de diâmetro x 120mm de comprimento.

4.2.5 Tubos de Durhan

De borossilicato ou vidro neutro, de 9mm de diâmetro e 45mm de comprimento.

4.2.6 Frasco para água de diluição

De borossilicato ou vidro neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas, com capacidade para conter 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.7 Pipetas

Tipo Mohr, para 10mL, 5mL, 2mL e 1mL, com graduação de 1/10 e erro volumétrico inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis de plástico, estéreis, ou de vidro borossilicato.

4.2.8 Placas de Petri

Devem ser de borossilicato ou de vidro neutro de boa qualidade, com 100mm de diâmetro e 15mm de altura ou de plástico não tóxico, de 90mm de diâmetro e 15mm de altura.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5mm de diâmetro e 7 a 8cm de comprimento, com um aro de 3mm de diâmetro numa extremidade e a outra fixada a um cabo metálico (cabo de Kolle).⁴

4.3.2 Bandejas de plástico ou aço inoxidável

Devem ser forradas com material absorvente embebido em água, para fornecer a umidade requerida durante a incubação das placas de Petri contendo as membranas após a filtração das amostras.

4.3.3 Bicos de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.4 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.5 Estantes

4 Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante 2 horas. Após o uso, as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 30 minutos e descartadas.

De aço inoxidável ou galvanizado plastificado, de tamanho adequado para acomodação dos tubos de ensaio.

4.3.6 Estojos para pipetas

Usar estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado, para acondicionamento das pipetas a serem esterilizadas. Opcionalmente, as mesmas podem ser embrulhadas individualmente em papel apropriado para a esterilização.

4.3.7 Membranas filtrantes

De ésteres mistos de celulose, ou de ésteres de celulose e nitrato de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis.

4.3.8 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.9 Placas de Petri para membrana filtrante

De plástico não tóxico, estéreis, bem vedadas, de 49mm de diâmetro x 13mm de altura.

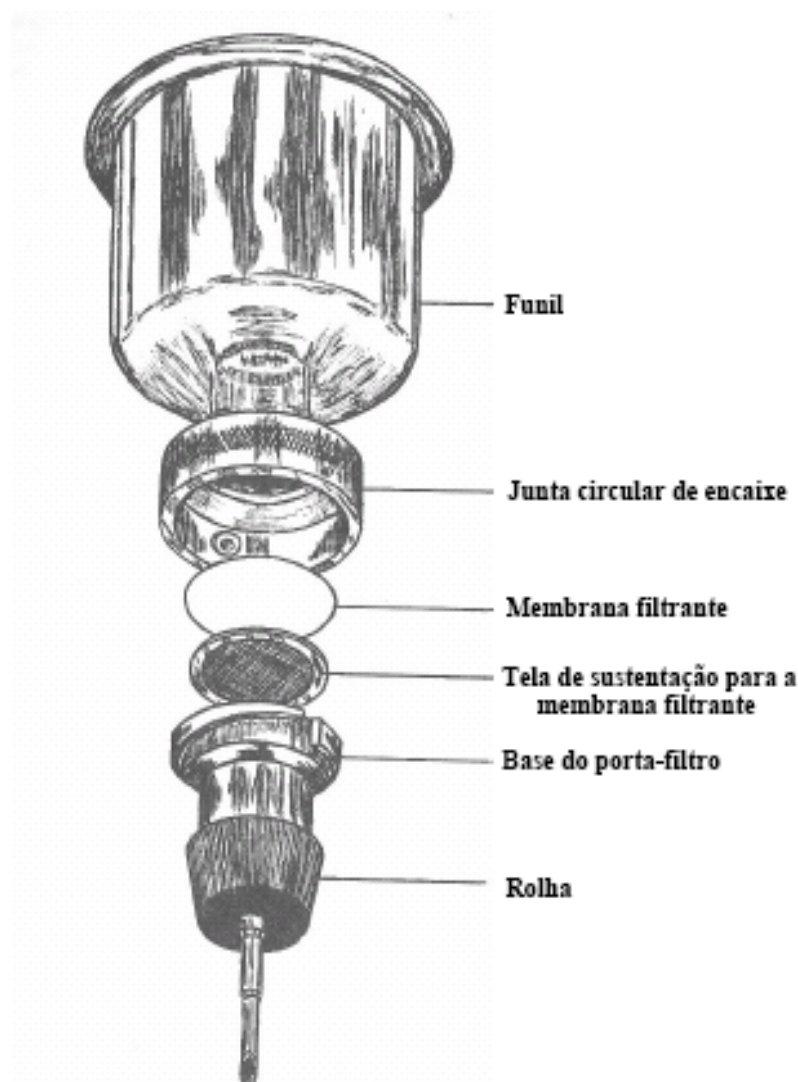
4.3.10 Termômetros

Os termômetros de mercúrio devem ter escala adequada ao uso e a coluna não deve apresentar interrupções. Também podem ser utilizados termômetros eletrônicos digitais, desde que apresentem faixa, sensibilidade e exatidão adequadas.

4.3.11 Lâmpada ultravioleta

Lâmpada de luz ultravioleta de comprimento de onda de 365nm e 6 watts de potência.

FIGURA 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração



5 Meios de culturas e soluções

5.1 m-Endo Ágar LES

5.1.1 Fórmula

Extrato de levedura	1,2 g
Casitona ou tripticase	3,7 g
Tiopeptona ou tiotona	3,7 g
Triptose	7,5 g
Lactose	9,4 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	3,3 g
Cloreto de sódio (NaCl)	3,7 g
Desoxicolato de sódio	0,1 g
Lauril sulfato de sódio	0,05 g
Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃)	1,6 g
Fucsina básica	0,8 g
Ágar	15,0 g
Água destilada (contendo 20mL de álcool etílico a 95%)	1000mL

pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$

5.1.2 Preparo

Pesar 51g do meio desidratado “m-Endo Ágar LES” e acrescentar 1000mL de água destilada, contendo 20mL de álcool etílico a 95%. Deixar em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Não autoclar. Estabilizar a temperatura do meio a 45-50°C em banho-maria. A seguir, distribuir, assepticamente, volumes de 4 –4,5mL em placas de Petri de 49mm x 13mm, estéreis. Não expor as placas à luz solar durante a distribuição.

Observações:

- evitar exposição excessiva ao calor durante a dissolução, pois isto pode determinar a perda ou redução da especificidade do meio. Para isto, é aconselhável preparar volumes de meio inferiores a 1L (cerca de 300mL);
- o álcool etílico, utilizado na concentração de 2% (v/v), deve ser de grau analítico (p.a.). Álcool etílico desnaturado não deve ser empregado, pois os desnaturantes utilizados são o metanol e o propanol, ambos tóxicos para os coliformes. A finalidade da adição de álcool etílico no “m-Endo Ágar LES” é a formação de ésteres, essenciais ao desenvolvimento das colônias de coliformes com brilho máximo e a inibição do crescimento de um número significativo de organismo não coliformes, evitando o crescimento confluinte.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas.

5.2 Caldo Lauril Triptose com púrpura de bromocresol

5.2.1 Fórmula

Triptose	20,0 g
Lactose	5,0 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	2,75 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	2,75 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g

Lauril sulfato de sódio	0,1 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Água destilada	1000mL

pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,2$

5.2.2 Preparo

Pesar 35,6 g do meio desidratado Caldo lauril triptose e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁵

5.2.3 Armazenamento

O meio reparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.3 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% - C.L.V.B.B.**5.3.1 Fórmula**

Peptona-----	10,0 g
Lactose-----	10,0 g
Bile de boi desidratada-----	20,0 g
Verde brilhante-----	0,0133 g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,2

5.3.2 Preparo

Pesar 40g do meio desidratado Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm, contendo em seu interior tubos de Durham ou não invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁶

5.3.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.4 Meio EC**5.4.1 Fórmula**

Triptose-----	20,0g
Lactose-----	5,0 g

⁵ No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e esterilização não deve exceder duas horas.

⁶ Ver nota de rodapé nº5.

Mistura de sais biliares ou sais biliares nº 3 -----	1,5 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄). -----	1,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).. -----	4,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).-----	5,0 g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2

5.4.2 Preparo

Pesar 37g do meio desidratado EC e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.4.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.5 Meio EC-MUG**5.5.1 Fórmula**

Triptose-----	20,0 g
Lactose-----	5,0 g
Mistura de sais biliares ou sais biliares nº 3 -----	1,5 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄). -----	1,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).. -----	4,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).-----	5,0 g
4-metil-umbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG) -----	0,05g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2

5.5.2 Preparo

Pesar 37,1g do meio desidratado EC-MUG e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 15mm x 150mm com tampa de rosca e que não apresentem fluorescência sob luz ultravioleta (comprimento de onda de 365nm), distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.5.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.6 Ágar eosina-azul de metileno (segundo Levine)**5.6.1 Fórmula**

Peptona.....	10,0g
Lactose	10,0g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).....	2,0g

Eosina	0,4g
Azul de metileno	0,065g
Ágar.....	15,0g
Água destilada	1000mL

pH final após esterilização: 7,1 ± 0,1 a 25°C

5.6.2 Preparo

Pesar 37,5g do meio desidratado Ágar eosina-azul de metileno e acrescentar 1000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Distribuir volumes de aproximadamente 12mL em placas de Petri de 15mm x 90mm.

Observações:

- durante a esterilização, poderá ocorrer descoloração do meio, o qual voltará à coloração normal após o resfriamento.
- após a autoclavação, pode ocorrer a formação de um precipitado, o qual deve ser ressuspensão, através de homogeneização lenta do meio no frasco, antes de sua distribuição em placas de Petri.

5.6.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, durante, no máximo, duas semanas.

5.7 Ágar nutriente**5.7.1 Fórmula**

Peptona.....	5,0g
Extrato de carne.....	3,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada	1000mL

pH final após esterilização: 6,8 ± 0,1 a 25°C

5.7.2 Preparo

Pesar 23g do meio desidratado Ágar nutriente e acrescentar 1000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7mL em tubos de ensaio de 12mm x 120mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.7.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, durante, no máximo, duas semanas.

5.8 Água de diluição**5.8.1 Fórmula**

Solução-estoque A-----	1,25mL
Solução-estoque B-----	5,00mL
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,2

5.8.2 Preparo

a) preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄). -----	34,0 g
Água destilada	1000mL

Preparo: Dissolver dihidrogeno fosfato de potássio em 500mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,5 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, durante no máximo 2 meses.⁷

b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio hexaidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)-----	81,1g
Água destilada q.s.p. -----	1000mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada e completar o volume para 1000mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frasco com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, durante no máximo 2 meses.

c) adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B em um litro de água destilada;

d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 90 ± 2mL;⁸

e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.8.3 Armazenamento

A solução preparada poderá ser estocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas.

5.9 Solução de hidróxido de sódio 1N**5.9.1 Fórmula**

Hidróxido de sódio (NaOH) -----	40,0g
Água destilada q.s.p. -----	1000mL

5.9.2 Preparo

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

5.9.3 Armazenamento

Em frasco com tampa de rosca. Manter em temperatura ambiente, durante no máximo 6 meses.

⁷ Antes da utilização da solução-estoque A deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

⁸ A água de diluição a ser utilizada no enxágue de porta-filtro, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões, erlenmeyers, ou frascos de polipropileno, em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização por autoclavação, de acordo com o volume de água por balão e a carga da autoclave (exemplo: 30 minutos para volumes de 500 e 1000mL).

5.10 Reagentes para o teste de oxidase**5.10.1 Fórmula**

Cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. -----	0,1 g
Água destilada.-----	10mL

5.10.2 Preparo

Pesar o cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina e acrescentar 10mL de água destilada. Homogeneizar bem até a sua completa dissolução.

5.10.3 Armazenamento

Em frasco âmbar, sob refrigeração, durante, no máximo, uma semana.

6 Execução do ensaio

6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para quantificação de coliformes baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante com porosidade de 0,45µm. As bactérias, apresentando dimensões maiores que o poro da membrana, ficarão retidas em sua superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial m-Endo Ágar LES. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período de 22-24 h de incubação a 35 ± 0,5°C se desenvolverão colônias de coliformes. Para a confirmação das colônias, faz-se a transferência das mesmas para caldo lauril triptose, com posterior confirmação em caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%. Paralelamente à verificação das colônias, pode-se obter a diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli*. Essa diferenciação pode ser feita qualitativamente (item 6.6.1) ou quantitativamente (item 6.6.2), transferindo-se todo o crescimento da superfície da membrana ou cada colônia para o meio diferencial EC ou EC-MUG.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1988).

6.3 Procedimento

6.3.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem filtrados em função de sua procedência, segundo especificações a seguir:

- para águas destinadas ao consumo humano, é requerida a análise de um volume mínimo de 100mL da amostra, o qual é filtrado diretamente, no caso de águas de boa qualidade, ou subdividido em volumes menores, dependendo do grau de contaminação fecal que pode estar presente.
- para outros tipos de água, incluindo águas superficiais marinhas ou doces, pode ser requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra), dependendo do grau de contaminação fecal presente.

6.3.2 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando como desinfetante álcool etílico 70%.

6.3.3 Disponibilizar sobre a mesma os seguintes materiais:

- porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao suporte de filtração (Manifold), o qual é conectado a um frasco kitassato, que por sua vez é conectado a um frasco kitassato de proteção, e este à fonte de vácuo;
- placas de Petri, de 49 x 13mm, contendo o meio m-Endo Ágar LES, identificadas com o número da amostra e o volume a ser filtrado;
- pinças com as extremidades mergulhadas em álcool etílico contido em um béquer;
- bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;
- provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra. Podem ser utilizados porta-filtros graduados com marcação externa, desde que os mesmos apresentem erro volumétrico inferior a 2,5%;
- água de diluição estéril, contida em balões, erlenmeyers ou frascos de polipropileno de 1000mL; e
- membranas filtrantes de ésteres mistos de celulose, ou de éster de celulose e nitrato de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis.

6.3.4 Preparação do porta-filtro

- retirar a parte superior do porta-filtro e, com as extremidades de uma pinça, previamente flambadas e resfriadas, colocar uma membrana filtrante estéril, com a face quadriculada voltada para cima, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro;
- acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana;
- para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição tamponada estéril no início de cada série de filtração e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para a filtração

6.3.5.1 Para volumes superiores a 10mL:

- homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, de modo a formar um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço
- distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas e proceder à filtração conforme o item 6.3.6.

6.3.5.2 Para volumes iguais ou inferiores a 10mL:

- homogeneizar a amostra conforme descrito em 6.3.5.1.a e, com o auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume desejado e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração);
- homogeneizar e proceder à filtração conforme o item 6.3.6.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra):

- efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:
 - proceder a marcação de cada frasco de água de diluição estéril, anotando o número da amostra e a diluição que deverá conter;
 - homogeneizar a amostra (conforme o item 6.3.5.1.a) e, com uma pipeta estéril de 10mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10⁻¹), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,1mL da amostra;
 - repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10⁻¹) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10mL, transferir 10mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ± 2mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10⁻²), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,01mL da amostra;
 - proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10⁻³, 10⁻⁴, ...10⁻⁸,...);

- após o preparo das diluições e homogeneização da diluição selecionada para a filtração (conforme o item 6.3.5.1.a), retirar 1mL de cada diluição com uma pipeta estéril e adicionar a frascos contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração). Homogeneizar e proceder a filtração conforme o item 6.3.6.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação

6.3.6.1 Verter cuidadosamente o volume da amostra a ser examinado no porta filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores do mesmo.

6.3.6.2 Ligar o sistema ou a bomba de vácuo e proceder a filtração.

6.3.6.3 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro três vezes com porções de 20-30mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

6.3.6.4 Desligar a válvula de controle de vácuo do porta-filtro, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante, desligando o vácuo imediatamente após o término do processo de filtração.

6.3.6.5 Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça, cujas extremidades foram flambadas e resfriadas, retirar com cuidado a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à inferior.

6.3.6.6 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado.

Observação: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça, previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar um movimento giratório da mesma, para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, sempre com a extremidade da pinça, levantar a borda da membrana mais próxima à bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo seu crescimento (Figura 2).

6.3.6.7 Tampar a placa de Petri.

6.3.6.8 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril, e proceder a filtração da próxima amostra.⁹

6.3.6.9 Após as filtrações, colocar as placas contendo o meio de cultura e a membrana, em posição invertida em bandejas, em cujo fundo foram colocadas folhas de papel toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água e incubar as placas a 35 ± 0,5°C, durante 22-24 horas.

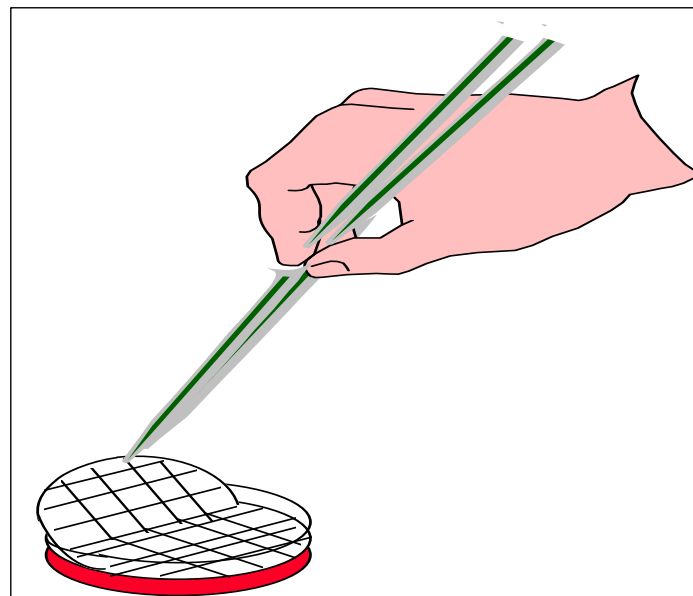


FIGURA 2 - Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

6.3.7 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópio (com iluminação fluorescente branca, colocada em direção a mais próxima possível da perpendicular em relação ao plano da membrana), efetuar a contagem das colônias típicas e atípicas de coliformes.¹⁰

6.4 Leitura

6.4.1 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias de coliformes totais em m-Endo Ágar

⁹ Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtração e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os mesmos devem ser esterilizados novamente ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental.

¹⁰ A colônia típica de coliforme apresenta coloração rosa a vermelho-escuro, com brilho metálico, que pode recobrir parcial ou totalmente sua superfície. Colônias atípicas de coliformes podem ser vermelho-escuro, mucóides ou nucleadas, sem brilho. Em geral, colônias cor-de-rosa, azuis ou incolores, sem brilho metálico são não-coliformes.

LES situam-se entre 20 a 80, sendo que a contagem total de todos os tipos de colônias deve ser inferior a 200. Para essa contagem, observar as figuras 3 e 4.

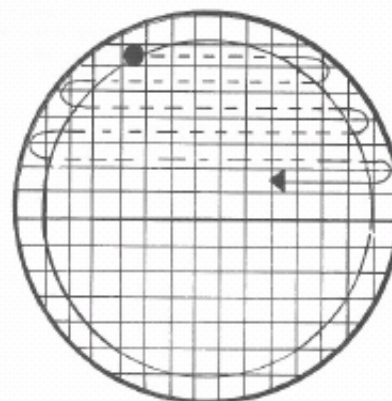


FIGURA 3 - Modelo para contagem das colônias (o círculo interior indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem)

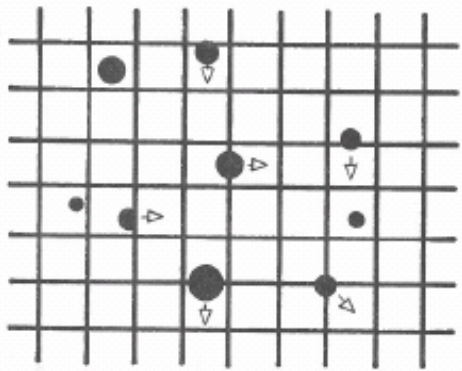


FIGURA 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento (as colônias são contadas nos quadrados indicados pela setas)

6.4.2 No caso de terem sido filtrados vários volumes, selecionar para leitura apenas aquele(s) que tiver(em) fornecido contagem de colônias dentro dos limites aceitáveis.

6.4.3 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias de coliformes, não considerar o limite mínimo e efetuar a leitura em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amostra.

6.4.4 Quando todos os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo o **item 7.2.1.1**.

6.4.5 Quando a estimativa visual do total de colônias for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), a contagem não é efetuada. Nestes casos deve ser avaliada a necessidade de coleta da amostra para seleção de volume mais adequados para filtração de forma que sejam obtidas contagens de colônias dentro dos limites aceitáveis.

6.5 Procedimento de confirmação de Coliformes Totais

6.5.1 Selecionar um número de 10 colônias típicas e atípicas bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de confirmação (se o número total de colônias típicas e atípicas, for menor que 10, confirmar todas as colônias).

6.5.2 Identificar tubos de caldo lauril triptose, em concentração simples, de tal modo que a cada colônia corresponda um tubo de meio.

6.5.3 Com auxílio de uma agulha de inoculação, devidamente flambada e resfriada, ou com o auxílio de uma haste de madeira estéril, transferir um inóculo de cada colônia para o tubo de caldo lauril triptose correspondente.

6.5.4 Após a transferência, incubar todos os tubos de caldo lauril triptose a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

6.5.5 Após o período determinado de incubação, efetuar a primeira leitura, considerando resultado positivo para os tubos que apresentarem gás no tubo de Durham invertido. Registrar os resultados. Os tubos com resultados negativos nessa leitura são reincubados e reexaminados após 24 ± 1 hora.

6.5.6 Efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), separando os tubos com resultado positivo e desprezando agora os tubos com resultado negativo.

6.5.7 Todos os tubos que apresentarem resultados positivos no caldo lauril triptose deverão ser submetidos à confirmação em caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B.B.) imediatamente após as respectivas leituras.

6.5.8 Para essa confirmação, identificar inicialmente tubos de C.L.V.B.B. em correspondência a cada tubo de caldo lauril triptose, com resultado positivo.

6.5.9 Homogeneizar bem as culturas positivas em caldo lauril triptose e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada ou haste de madeira estéril, retirar um inóculo dessa cultura e transferi-lo para o tubo de C.L.V.B.B. correspondente, evitando a película superficial que pode se formar no caldo lauril triptose.

6.5.10 Incubar todos os tubos de C.L.V.B.B. inoculados, durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

6.5.11 Efetuar a primeira leitura após 24 ± 2 horas, considerando teste confirmativo positivo para coliformes totais todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de Durham invertido. Registrar os resultados. Os tubos que apresentarem resultados negativos nessa leitura são reincubados e reexaminados após 24 ± 1 hora.

6.5.12 Efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), separando os tubos com resultado positivo e desprezando agora os tubos com resultado negativo.

6.5.13 A partir do número de colônias confirmadas como coliformes totais, calcular a densidade destas bactérias conforme o **item 7.1.1**.

Observação:

a) é aceitável a inoculação simultânea das colônias submetidas à confirmação, para caldo lauril triptose e caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B.B.). A incubação e a leitura de ambos os meios de cultura devem ser efetuados segundo especificado em **6.5.4** a **6.5.13**.

b) nos casos em que ocorrerem colônias em grande número (superior a 200) ou o crescimento for confluyente, remover todo o crescimento na superfície da membrana, com auxílio de uma alça de inoculação (devidamente flambada e resfriada) ou uma haste de madeira estéril, e transferir para um tubo de caldo lauril triptose. O prosseguimento do teste de confirmação é efetuado conforme já descrito nos **itens 6.5.4** a **6.5.13**. Para a expressão dos resultados, observar o exposto no **item 7.2.1**.

6.6 Diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli*

6.6.1 O teste de diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli* pode ser feito de forma qualitativa, sendo requerida a ausência destas bactérias em 100mL da amostra, segundo legislação vigente em nosso país para avaliação da qualidade de águas de consumo humano. É efetuado paralelamente à confirmação para coliformes totais, após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose das colônias selecionadas para confirmação. Para sua realização, observar a seqüência descrita a seguir:

6.6.1.1 Identificar, com o número da amostra, um tubo contendo meio EC ou EC-MUG, previamente mantido a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos;

6.6.1.2 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ou haste de madeira estéril) e após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose das colônias a serem confirmadas como coliformes totais (**item 6.5.3**), remover todo o crescimento bacteriano restante na superfície da membrana filtrante e transferi-lo para o tubo de meio EC ou EC-MUG;

6.6.1.3 Incubar o tubo de EC ou EC-MUG, no máximo até 30 minutos após a transferência do crescimento bacteriano, em banho-maria ou incubadora, a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 horas;

6.6.1.4 Após esse período, proceder à leitura e registro, considerando como resultado positivo, como segue:

- Coliformes termotolerantes: formação de gás, o qual fica retido no tubo de Durham invertido;
- *E. coli*: presença de fluorescência azul no tubo após leitura sob lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365nm (6 watts de potência), em ambiente escuro.

Observação: ao se efetuar a leitura do EC-MUG, utilizar um controle positivo (*E. coli*) e um controle negativo (meio não inoculado), a fim de se evitar um resultado falso-positivo devido a fraca autofluorescência do meio EC MUG.

6.6.1.5 Expressar os resultados relativos a coliformes termotolerantes ou *E. coli* segundo o **item 7.2.2.1**.

6.6.1.6 Nos casos especificados na observação **b** do **item 6.5.13** (número de colônias acima de 200 ou crescimento confluyente), a diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli* é efetuada a partir de tubo do caldo lauril triptose para o qual foi transferido todo o crescimento bacteriano da superfície da membrana.

6.6.2 Para diferenciação quantitativa dos coliformes termotolerantes ou *E. coli*, deve ser realizada a seqüência descrita a seguir:

6.6.2.1 Identificar com o número da amostra o número de tubos de EC ou EC-MUG necessários, previamente mantidos a $44,5 \pm 0,5^\circ$ durante 30 minutos. Devem ser submetidas ao teste de diferenciação pelo menos 10 colônias típicas. Se o número total de colônias for inferior a 10, todas devem ser submetidas ao teste.

6.6.2.2 Com o auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ou haste de madeira estéril), e após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose, transferir cada colônia para um tubo de EC ou EC MUG.

6.6.2.3 Incubar os tubos de EC ou EC-MUG, no máximo até 30 minutos após a transferência das colônias, em banho-maria ou incubadora, a $44,5 \pm 0,5^\circ$ durante 24 ± 2 horas.

6.6.2.4 Após esse período proceder à leitura e registro, considerando como resultado positivo:

- Coliformes termotolerantes: formação de gás, o qual fica retido no tubo de Durham invertido;
- *E. coli*: presença de fluorescência azul no tubo sob lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365nm (6 watts de potência), em ambiente escuro.

Observação: ao se efetuar a leitura do EC-MUG, utilizar um controle positivo (*E. coli*) e um controle negativo (meio não inoculado), a fim de se evitar um resultado falso-positivo devido a fraca autofluorescência do meio EC -MUG.

6.6.2.5 Expressar os resultados de coliformes termotolerantes ou *E. coli*, conforme descrito no **item 7.2.2.2**.

7 Resultados

7.1 Cálculo dos resultados

7.1.1 Coliformes totais

7.1.1.1 Para contagens de colônias típicas iguais ou inferiores a 10 calcular a densidade de coliformes totais em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes totais/100mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} \times 100}{\text{Volume filtrado da amostra (mL)}}$$

Exemplo:

Volume filtrado: 100mL

Total de colônias no m-Endo Ágar LES : 9

Total de colônias submetidas à confirmação em C.L.V.B.B.: 9

Nº de colônias com resultados positivos em C.L.V.B.B.: 7

$$\text{Coliformes totais/100mL} = \frac{7 \times 100}{100} = 7$$

7.1.1.2 Para contagens de colônias típicas superiores a 10, considerar as duas possibilidades seguintes:

a) Quando todas as 10 colônias testadas apresentarem confirmação positiva (confirmação de 100%), considerar o seguinte:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas}$$

Calcular a densidade de coliformes totais por meio da aplicação da fórmula descrita no **item 7.1.1**.

b) Quando nem todas as 10 colônias testadas apresentarem confirmação positiva, há necessidade de se calcular inicialmente o número total de colônias confirmadas através de extrapolação aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas} \times \text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas}}{\text{N}^\circ \text{ de colônias submetidas à confirmação}}$$

A seguir, calcular a densidade de coliformes totais, aplicando a fórmula descrita no **item 7.1.1**.

Exemplo:

Volume filtrado: 20mL

Número total de colônias típicas no m-Endo Ágar LES: 40

Número de colônias submetidas à confirmação em C.L.V.B.B.: 10

Número total de colônias confirmadas (com resultados positivo) em C.L.V.B.B.: 8

$$N^{\circ} \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{40 \times 8}{10} = 32$$

$$\text{Coliformes totais/100 mL} = \frac{32 \times 100}{20} = 160$$

7.1.1.3 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado, conforme item 6.4.3, calcular a densidade em 100mL através da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes totais/100mL} = \frac{\text{Soma das colônias confirmadas}}{\text{Soma dos volumes correspondentes (mL)}} \times 100$$

Exemplos:

a) Volumes filtrados: 4 de 25mL
 N° total de colônias confirmadas: 16, 21, 17 e 14
 Cálculo da densidade de coliformes totais por 100mL:

$$\frac{(16 + 21 + 17 + 14)}{(25 + 25 + 25 + 25)} \times 100 = 68$$

b) Volumes filtrados: 70, 25 e 5mL
 N° total de colônias confirmadas: crescimento confluyente, 70 e 20
 Cálculo da densidade de coliformes totais por 100mL:

$$\frac{(70 + 20)}{(25 + 5)} \times 100 = 300$$

7.1.1.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizarem 100mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e utilizar a fórmula geral apresentada no item 7.1.1 para o cálculo da densidade de coliformes totais em 100mL e item 7.2.1.1.b para a expressão dos resultados.

7.1.2 Coliformes termotolerantes ou E. coli

7.1.2.1 Para contagens de colônias típicas iguais ou inferiores a 10, calcular a densidade de coliformes termotolerantes ou E. coli em 100mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes termotolerantes/100mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de colônias diferenciadas}}{\text{Volume filtrado de amostra (mL)}} \times 100$$

Exemplo:

Volume filtrado: 100mL
 Total de colônias no m-Endo ágar LES: 8
 Total de colônias submetidas à diferenciação: 8
 N° de colônias com resultados positivos em EC ou EC-MUG: 7
 Coliformes termotolerantes ou E. coli/100mL = $\frac{7 \times 100}{100} = 7$

7.1.2.2 Para contagens de colônias típicas superiores a 10, submeter 10 colônias típicas à diferenciação e considerar as duas possibilidades seguintes:

a) quando as 10 colônias testadas apresentarem resultado positivo para coliformes termotolerantes ou E. coli (diferenciação de 100%):

$$N^{\circ} \text{ total de colônias confirmadas} = N^{\circ} \text{ total de colônias típicas}$$

Calcular a densidade de coliformes termotolerantes ou E. coli, por meio da fórmula descrita no item 7.1.1.1.

b) quando nem todas as 10 colônias testadas apresentarem resultado positivo para coliformes termotolerantes ou E. coli, é necessário calcular inicialmente o número total de colônias diferenciadas por extrapolação aplicando a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ total de colônias diferenciadas} = \frac{N^{\circ} \text{ total colônias típicas} \times N^{\circ} \text{ total colônias diferenciadas}}{N^{\circ} \text{ colônias submetidas à diferenciação}}$$

Exemplo:

Volume filtrado: 25mL
 Número total de colônias típicas no m-Endo ágar LES: 40
 Número de colônias submetidas à confirmação em EC ou EC-MUG: 10
 Número total de colônias diferenciadas (com resultados positivos em EC ou EC-MUG): 5

$$N^{\circ} \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{40 \times 5}{10} = 20$$

$$\text{Coliformes termotolerantes ou E. coli/100mL} = \frac{20 \times 100}{25} = 80$$

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 Coliformes totais

Unidades formadoras de colônias de coliformes totais por 100mL ou UFC de coliformes totais/100mL

7.2.1.1 Quando o(s) volume(s) filtrado(s) fornecer(em) contagem(s) igual(is) a zero, há dois casos a serem considerados:

a) quando o(s) volume(s) filtrado(s) totalizar(em) 100mL: neste caso, expressar o resultado como:

$$\text{Unidade formadora de colônias de coliformes totais em 100mL} = < 1 \text{ (Ausente)}$$

b) quando o(s) volume(s) filtrado(s) não totalizar(em) 100mL: neste caso, observar o exposto no item 7.1.1.4 para o cálculo do resultado, expressando o valor obtido precedido do sinal < (menor que)

$$\text{Unidade formadora de colônias de coliformes totais em 100mL} = < \text{valor obtido}$$

7.2.1.2 Quando a contagem não for efetuada, devido ao grande número de colônias típicas e/ou atípicas que se desenvolveram na membrana (>200) ou à ocorrência de crescimento confluyente, o resultado é expresso em função do resultado do teste de confirmação para coliformes totais:

7.2.1.3 Quando o teste de confirmação para coliformes totais for positivo, relatar o resultado como:

Presença de coliformes totais - contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

7.2.1.4 Quando o teste fornecer resultado negativo, relatar o resultado final conforme item 7.2.1.1 a.

7.2.2 Coliformes termotolerantes ou E. coli

7.2.2.1 Teste qualitativo, expressar o resultado como:

Coliformes termotolerantes ou E. coli: Presente ou Ausente em 100mL

(de acordo com o resultado obtido no teste de diferenciação)

7.2.2.2 Teste quantitativo

Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes/100mL ou E. coli/100mL ou UFC de coliformes termotolerantes ou E. coli/100mL

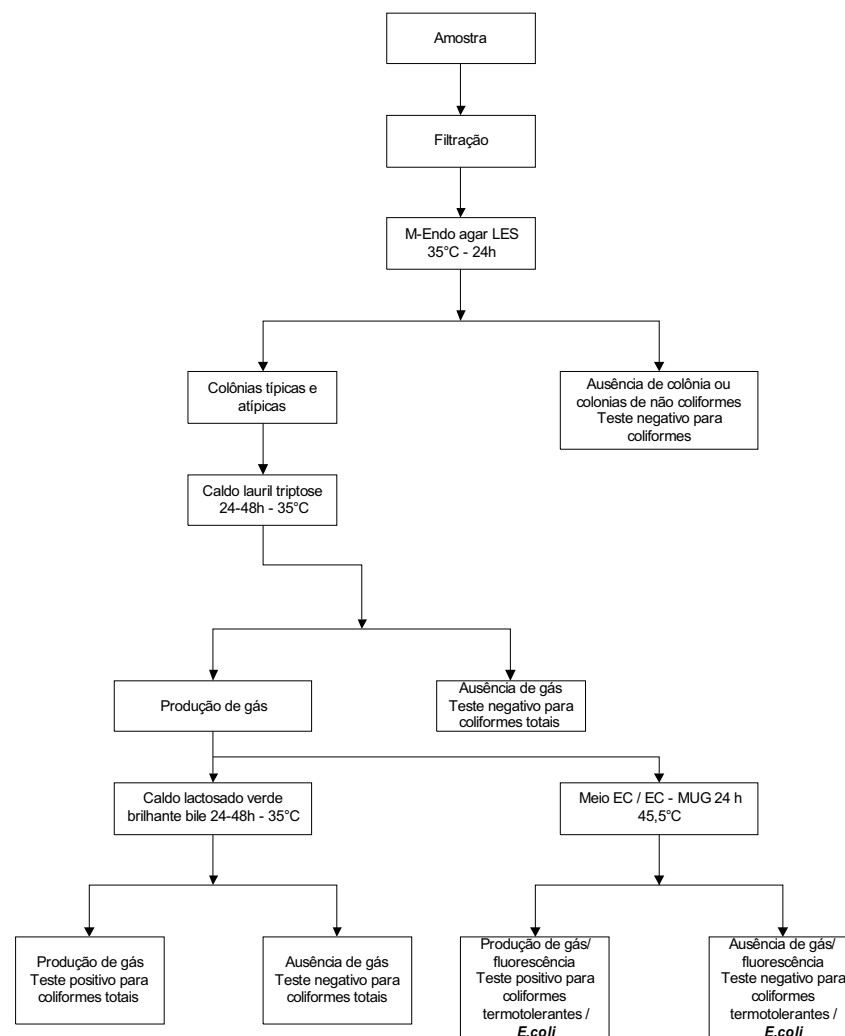


FIGURA 5 - Esquema de procedimentos para determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou E. coli pela técnica de membrana filtrante

8 Testes complementares para confirmação de coliformes totais

8.1 Teste para pesquisa de oxidase

Este teste é recomendado como um procedimento adicional de controle de qualidade analítica, devendo ser aplicado a, no mínimo, 10% das colônias típicas que apresentarem resultados positivos no teste confirmativo para coliformes. O objetivo desse teste é eliminar a possibilidade de resultados falsos-positivos, que podem ocorrer quando estiver presente na amostra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que tem a capacidade de fermentar a lactose. Para a execução deste teste, observar a seqüência descrita a seguir:

- para cada tubo positivo de C.L.V.B.B., correspondente à confirmação de colônias típicas em m-Endo Ágar LES, identificar placas de Ágar eosina-azul de metileno (EAM);
- homogeneizar bem a cultura positiva em C.L.V.B.B. e, inclinando o tubo, mergulhar a extremidade de uma alça de inoculação (devidamente flambada e resfriada), a uma profundidade de, aproximadamente, 1cm, para colher um inóculo dessa cultura;
- depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de EAM, girá-la e iniciar seu espalhamento por estrias, até completar a semeadura em toda a sua superfície;
- fechar a placa e incubar, em posição invertida, durante 24 ± 2 horas a 35 ± 0,5°C;
- após esse período de incubação, efetuar a leitura, considerando como típicas de coliformes as colônias nucleadas, com ou sem brilho metálico; considerar como colônias atípicas de coliformes as colônias róseas, mucóides, opacas, sem núcleo e, como colônias negativas, todos os outros tipos;
- selecionar uma colônia típica bem isolada e, com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo da mesma para um tubo de Ágar nutriente, semeando-o por estrias na superfície inclinada desse meio;
- incubar o Ágar nutriente durante 18-24 horas a 35 ± 0,5°C;
- a partir do crescimento em Ágar nutriente, efetuar o teste para pesquisa de oxidase;
- com auxílio de uma alça de inoculação de platina, devidamente flambada e resfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento em Ágar nutriente e tocar uma folha de papel de filtro, previamente colocada no fundo de uma placa de Petri estéril e embebida em solução de cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul intensa em aproximadamente 30 segundos, no local em que foi depositada a cultura. Se nenhuma ou discreta reação se desenvolver no período de dois minutos de observação, considera-se o resultado negativo. Os coliformes não possuem a enzima citocromo-oxidase, sendo esperada, portanto, resposta negativa neste teste. Para a realização do teste, usar sempre, como controle positivo, uma cultura oxidase-positiva (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*) e uma cultura oxidase-negativa (*Escherichia coli*).

9 Referências

APHA; AWWA; WEF. Membrane filter technique for members of the coliform group. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. . Washington, DC: APHA, 2005. Part 9222B.

BORDNER, R.H. ; WINTER, J. A. (Ed.). **Microbiological methods for monitoring the environment** : water and wastes. Washington, DC: EPA, 1978. 338 p. (EPA/600/8-78-017; PB 290329/2BE).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial da União - República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. **Diário Oficial da União - República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: mar. 2007.

CETESB (São Paulo). **L4.214: Coliformes Totais**: Determinação pela Técnica de Membrana Filtrante. São Paulo, 1992. 47 p.

LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.A.; EDBERG, S.C. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Reviews Microbiology** . v.55, p. 301-234, 2001.

UNITED KINGDOM. Environment Agency. Standing Committee of Analysts. **The microbiology of drinking water**: water quality and public health. Part 1. Nottingham, 2002. 50 p. (Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, blue book 176). Disponível em: <<http://www.environment-agency.gov.uk/commondata/acrobat/mdwpart1.pdf>>. Acesso em: mar. 2007.

UNITED STATES. EPA. Microbiology. In _____. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**. 5th ed. Cincinnati, 2005. Chap. V-1 – V-77.

WHO. **Guidelines for drinking water quality**. 3rd ed. Geneva, 2004. v. 1: recommendations. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html> Acesso em: mar. 2007.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

DECISÃO DE DIRETORIA Nº 215/2007/E, de 07 de novembro de 2007.

Dispõe sobre a sistemática para a avaliação de incômodo causado por vibrações geradas em atividades poluidoras.

A Diretoria Plena da CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, no uso de suas atribuições estatutárias e regulamentares, e considerando o contido no Relatório à Diretoria nº 049/2007/E, que acolhe, DECIDE:

Artigo 1º: Ficam estabelecidos os seguintes critérios para as ações de controle ambiental das atividades poluidoras que emitam vibrações contínuas:

I - os limites de velocidade de vibração de partículas (pico), considerando os tipos de áreas e período do dia, estão descritos na tabela abaixo:

Limites de Velocidade de Vibração de Partícula – Pico (mm/s)		
Tipos de áreas	Diurno (7:00 às 20:00)	Noturno (20:00 às 7:00)
Áreas de hospitais, casas de saúde, creches e escolas	0,3	0,3
Área predominantemente residencial	0,3	0,3
Área mista, com vocação comercial e administrativa	0,4	0,3
Área predominantemente industrial	0,5	0,5

Obs.: 1. Estes valores não se aplicam às avaliações de vibração de partícula gerada pela atividade de desmonte de rocha mediante utilização de explosivos (fogo primário).
2. Os limites são valores de referência para avaliação do incômodo. Caso os valores medidos, após a adoção de medidas de controle, forem superiores a estes, mas o incômodo cessar, não há necessidade da continuidade das ações de controle.

II - os valores de vibração apresentados deverão ser aplicados utilizando, quando existente, o zoneamento urbano do município ou, quando inexistente, observando a real ocupação do solo e os tipos de áreas descritos na tabela.

III – as avaliações de vibrações devem ser realizadas conforme descrito no Anexo 1 desta Decisão.

Artigo 2º: Esta Decisão de Diretoria entra em vigor na data de sua publicação.

Diretoria Plena da CETESB, em 07 de novembro de 2007.

FERNANDO REI
Diretor-Presidente

EDSON TOMAZ DE LIMA Fº
Diretor de Gestão Corporativa

OTAVIO OKANO
Diretor de Controle de Poluição Ambiental

MARCELO MINELLI
Diretor de Engenharia, Tecnologia e Qualidade Ambiental

ANEXO I a que se refere à Decisão de Diretoria nº 215/2007/E, de 07 de novembro de 2007

As avaliações de vibração deverão seguir os seguintes procedimentos técnicos:

- O equipamento a ser utilizado deverá realizar medições em velocidade de partículas (mm/s – pico) e estar devidamente aferido;
- O acelerômetro deverá ser fixado rigidamente nos locais a serem avaliados, sendo medidas as componentes horizontal e vertical da velocidade de vibração de partículas:
 - Horizontal: no centro das paredes e, quando houver janelas, logo abaixo delas. Não deverão ser efetuadas medições diretamente nas estruturas das janelas.
 - Vertical: no piso, a avaliação deverá ser procedida preferencialmente no centro do cômodo, evitando-se pontos onde o mesmo se apresente solto, não devendo ser avaliadas vibrações em locais cujo piso seja de carpete de madeira ou tecido.
- O cabo de conexão entre o equipamento de medição e o acelerômetro não deverá receber interferência física durante as avaliações.
- Durante as medições deverão ser desconsideradas as interferências alheias a fonte.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

DECISÃO DE DIRETORIA Nº 236/2007/P, de 28 de dezembro de 2007.

Dispõe sobre a aprovação da revisão do Regimento Interno de Câmaras Ambientais do Estado de São Paulo.

A Diretoria Plena da CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, no uso de suas atribuições estatutárias regulamentares, à vista de tudo quanto consta do Processo CETESB nº111/2007/310/P e considerando o contido no Relatório à Diretoria nº056/2007/P, que acolhe, DECIDE:

Artigo 1º : APROVAR a revisão do Regimento Interno de Câmaras Ambientais do Estado de São Paulo – dez/2007/P, constante do Anexo Único que integra esta Decisão de Diretoria.

Artigo 2º : Esta Decisão de Diretoria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se a Decisão de Diretoria da CETESB nº 019/95/P de 12 de setembro de 1995.

Diretoria Plena da CETESB, em 28 de dezembro de 2007.

FERNANDO REI
Diretor Presidente

EDSON TOMAZ DE LIMA Fº
Diretor de Gestão Corporativa

OTAVIO OKANO
Diretor de Controle de Poluição Ambiental

MARCELO MINELLI
Diretor de Engenharia, Tecnologia e Qualidade Ambiental

ANEXO ÚNICO A QUE SE REFERE A DECISÃO DE DIRETORIA Nº 236/2007/P, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2007.**REGIMENTO INTERNO DAS CÂMARAS AMBIENTAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

CAPÍTULO I – DOS OBJETIVOS

Artigo 1º - As Câmaras Ambientais do Estado de São Paulo são colegiados da Secretaria de Estado do Meio Ambiente – SMA, constituídos no âmbito da CETESB, de caráter consultivo, que têm como meta promover a melhoria da qualidade ambiental por meio da interação permanente entre o poder público e os setores produtivos e de infra-estrutura do Estado de São Paulo.

Artigo 2º - Os objetivos específicos desses colegiados são contribuir para:

- I – o aprimoramento e a implementação dos instrumentos de gestão ambiental do Estado;
- II – a concepção de políticas públicas de apoio à gestão ambiental do Estado;
- III - o exercício do planejamento estratégico da CETESB.
- IV – constituir um canal permanente de diálogo entre o Sistema de Meio Ambiente e os setores.

CAPÍTULO II- DA ORGANIZAÇÃO E CRIAÇÃO

Artigo 3º - As Câmaras Ambientais abrangem os seguintes setores da atividade econômica do Estado:

- a) Água e Esgoto;
- b) Alimentício;
- c) Celulose e Papel;
- d) Cítrico;
- e) Construção Civil;
- f) Couro e Calçados;
- g) Energético;
- h) Farmacêutico e veterinário;
- i) Fertilizantes;
- j) Mecânico, Metalúrgico e Siderúrgico;
- k) Mineração;
- l) Minerais não Metálicos;
- m) Petróleo e seus derivados;
- n) Processamento de Chumbo;
- o) Químico e Petroquímico;
- p) Resíduos;
- q) Serviços;
- r) Sucroalcooleiro;
- t) Têxtil;
- u) Transporte.

Parágrafo único - Poderão ser criadas Câmaras Ambientais para outros setores, mediante a aprovação da Diretoria Plena da CETESB.