THIAGO NEPOMUCENO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE L-CISTINA E DE SAIS BILIARES
NA TÉCNICA DE H₂S NA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM
AMBIENTES AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

THIAGO NEPOMUCENO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE L-CISTINA E DE SAIS BILIARES
NA TÉCNICA DE H₂S NA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM
AMBIENTES AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*)

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Thiago Nepomuceno.

Avaliação dos efeitos da adição de L-cistina e de sais biliares na técnica de H₂S na detecção de contaminação fecal em ambientes aquáticos / Thiago Nepomuceno Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Contaminação fecal.

Versão do título para o inglês: Effect evaluation of L-cystine and bile salts in H₂S method for fecal contamination detection in water environment.

1. Método H₂S 2. Contaminação fecal 3. Sulfeto de hidrogênio 4. Membrana filtrante 5. Colilert 6. L-cistina I. Schneider, Prof. Dr. René Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB06/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thiago Nepomuceno Silva.

Título da Dissertação: Avaliação dos efeitos da adição de L-cistina e de sais biliares na técnica de H₂S na detecção de contaminação fecal em ambientes aquáticos.

Orientador(a): Prof. Dr. René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **603/13** referente ao projeto intitulado: “*Deteção de Escherichia coli em ambientes aquáticos pela técnica FISH e PCR*” sob a responsabilidade de **Thiago Nepomuceno Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 08 de maio de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico a Irma Rivera (in memoriam)

Por toda dedicação e conhecimento transmitidos

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força concedida para superar os obstáculos presentes em meu trajeto.

A minha família que me apoiou ao iniciar esta etapa. Que mesmo separados pela distância, nos momentos difíceis sempre estiveram ao meu lado. Amo vocês.

A minha irmã, minha segunda mãe, que sempre me apoiou mesmo não podendo estar ao meu lado fisicamente e que sempre disse que eu devia seguir o meu caminho. Tenho muita admiração pela sua força de vontade e fé. Amo você.

A minha namorada Marcela que se não fosse por ela isso tudo não teria acontecido. Pela sua paz e tranquilidade e sua mágica em fazer de tudo para ajudar. Amo você.

À professora Irma Rivera pela confiança, orientação, incentivo e amizade que sempre será eterna. Abriu as portas de seu laboratório para me receber de braços abertos. Onde ela estiver, sei que está olhando por todos os seus alunos.

Ao professor Marcelo Lauretto pela ajuda na parte estatística, fundamental para o término deste trabalho.

Ao Flávio, a Nadia e a Zita pelo companheirismo e ajuda durante a fase mais conturbada do laboratório para conseguirmos seguir em frente nos nossos estudos e superar os desafios.

À Claudiana, Maicon, Vanessa, Lígia, Zita e Sr. Luís. Alunos, ex-alunos e técnicos de nossa equipe que contribuíram para o trabalho ser desenvolvido com alegria e companheirismo.

Aos amigos fora do círculo acadêmico, Cho, Tio e Flávio que proporcionaram momentos felizes e muitas conversas, onde sempre pude contar com o apoio de cada um.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

SILVA, T. N. **Avaliação dos efeitos da adição de L-cistina e de sais biliares na técnica de H₂S na detecção de contaminação fecal em ambientes aquáticos.** 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As fontes hídricas disponíveis para o consumo humano, ou para uso recreacional ou para o cultivo de alimentos marinhos, vêm sendo comprometidas pelo desenvolvimento industrial, crescimento demográfico e ocupação do solo sem planejamento. As doenças transmitidas pela água são causadas tipicamente pelas bactérias entéricas, as quais infectam o indivíduo por meio de água contaminada com efluentes domésticos e industriais sem o devido tratamento. Para resolver estes problemas, várias técnicas de detecção de contaminação fecal foram desenvolvidas a fim de melhorar o monitoramento da qualidade da água. Entretanto, um obstáculo é o elevado custo e tempo que demandam as principais técnicas utilizadas neste monitoramento. Em 1982, Manja e colaboradores desenvolveram uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, o método H₂S, onde se detecta micro-organismos produtores de sulfeto de hidrogênio e, assim, a contaminação fecal. Desde então, várias modificações foram sugeridas com intuito de melhorar sua sensibilidade. No presente trabalho foi analisado a eficácia de detecção de micro-organismos produtores de H₂S frente a adição de L-cistina (125 mg/L e 250 mg/L) e desoxicolato de sódio (0,1% e 0,3%). Estas modificações foram testadas de duas formas: com a presença apenas das bactérias produtoras de H₂S (*Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* e *Proteus mirabilis*) e com a presença também de bactérias não produtoras de H₂S com o intuito de verificar a presença dessas bactérias interferem na detecção dos isolados H₂S_{pos}. Os resultados deste estudo mostram que o meio H₂S com adição de 0,3% de desoxicolato de sódio e sem L-cistina (L000:D03) se mostrou mais sensível e mais rápido também. Realizou-se, também, a comparação da técnica H₂S (dois volumes de amostra, 20 e 100 mL) frente a metodologias clássicas (membrana filtrante e Colilert®). O teste H₂S com o meio L000:D03 apresentou uma sensibilidade maior do que o Colilert®. A sensibilidade do Colilert® (33%) e a acurácia (53%) foram baixas na detecção de *E. coli*. Já a especificidade foi de 80%. Referente ao volume utilizado pelo método H₂S, 100 mL de amostra apresentou uma especificidade menor do que 20 mL de amostra mas uma sensibilidade melhor.

Palavras-chave: Teste H₂S. Contaminação Fecal. Sulfeto de Hidrogênio. Membrana Filtrante. Colilert.

ABSTRACT

SILVA, T. N. **Effect evaluation of L-cystine and bile salts in H₂S method for fecal contamination detection in water environment.** 2016. 57 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Water supply for human consumption and recreational are in jeopardy by industrial development, demographic growth and lack of land-use planning. Waterborne diseases usually are caused by enteric bacteria, through untreated sewage water contamination. Several detection methods for fecal contamination have been developed to improve the water-quality monitoring. However, the regular techniques are expensive and time consuming. Manja and co-workers (1982) developed a simple, fast and low-cost method for fecal contamination based on detection of sulfate-reducing bacteria, the H₂S method. Since then, several modifications were suggested for sensibility improvement. This work aimed to analyze the detection efficiency of the H₂S method under different conditions: with L-cystine (125 mg/L e 250 mg/L) and sodium deoxycholate (0.1% e 0.3%). Two different scenarios were evaluated: (1) sulfate-reducing bacteria exclusively (*Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* and *Proteus mirabilis*), and (2) sulfate-reducing bacteria and non-sulfate-reducing bacteria, for eventual interference evaluation. The 0.3% sodium deoxycholate and L-cystine free condition (L000:D03) was the fastest and most sensitive medium. Two sample volume (20 mL and 100 mL) of the H₂S method were compared to the classic methodologies (membrane filtration and Colilert®). The (L000:D03) condition indicated a higher sensibility than Colilert®. Also, Colilert® sensibility (33%) and accuracy (53%) were low on *E. coli* detection however, the specificity was 80%. The 100 mL sample indicated a lower specificity compared to the smaller, nonetheless a higher sensibility.

Keywords: H₂S Strip Test. Fecal Contamination. Hydrogen Sulphide. Membrane Filtration. Colilert®.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do funcionamento da metodologia dos tubos múltiplos (número mais provável). Modificado de GERBA, 2009.....	18
Figura 2 – Esquema do funcionamento da técnica de membrana filtrante.	21
Figura 3 – Esquema geral dos três experimentos realizados no teste de sensibilidade.....	33
Figura 4 – Esquema do teste de sensibilidade.	34
Figura 5 – Modelo experimental dos ensaios I e II do teste de sensibilidade.	34
Figura 6 – Modelo experimental do experimento III do teste de sensibilidade.....	35
Figura 7 – Escala de cor utilizada para leitura dos resultados do H ₂ S. (1) Negativo; (2) a (6) Positivos.....	36
Figura 8 - Localização dos poços dentro do campus Cidade Universitária – USP (A1 a A5 – poços em processo de reativação para consumo; B6 a B8 – poços de monitoramento da bacia).....	38
Figura 9 – Número de repetições do teste com <i>P. mirabilis</i> (experimento I) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18 h e 24 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>P. mirabilis</i> (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).	42
Figura 10 – Número de repetições do teste com <i>S. typhimurium</i> (experimento I) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24, 36, 48, 60 e 72 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>S. typhimurium</i> (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).	42
Figura 11 – Número de repetições do teste com <i>C. freundii</i> (experimento I) que apresentaram resultado positivo forte (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>C. freundii</i> (8 - 18 e 30 - 36 UFC/mL).	43
Figura 12 – Número de repetições do teste com <i>P. mirabilis</i> mais <i>E. aerogenes</i> e <i>E. coli</i> a 10 ⁶ UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultados positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>P. mirabilis</i> (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).	44
Figura 13 – Número de repetições do teste com <i>S. typhimurium</i> mais <i>E. aerogenes</i> e <i>E. coli</i> a 10 ⁶ UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultados positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>S. typhimurium</i> (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).	44
Figura 14 – Número de repetições do teste com <i>C. freundii</i> mais <i>E. aerogenes</i> e <i>E. coli</i> a 10 ⁶ UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de <i>C. freundii</i> (8 - 18 e 30 - 36 UFC/mL).	45
Figura 15 – Número de repetições do teste com <i>P. mirabilis</i> mais <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>B. subtilis</i> a 10 ⁶ UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18 e 24 h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03, L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de <i>P. mirabilis</i> (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).	46
Figura 16 – Número de repetições do teste com <i>S. typhimurium</i> mais <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>B. subtilis</i> a 10 ⁶ UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03,	

L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de <i>S. typhimurium</i> (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).....	47
Figura 17 – Número de repetições do teste com <i>C. freundii</i> mais <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>B. subtilis</i> a 10^6 UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos forte (++) , positivo médio (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03, L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de <i>C. freundii</i> (8-18 e 30-36 UFC/mL).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplo de alteração nas diretrizes para a avaliação da qualidade da água potável de acordo com a realidade local. Adaptado de WHO, 2011.	27
Tabela 2. Combinações do meio H ₂ S com seus respectivos nomes.	30
Tabela 3 – Meios analisados e bactérias utilizadas em cada um dos experimento do teste de sensibilidade.	32
Tabela 4 – Comparação de duas técnicas (H ₂ S ou Colilert com membrana filtrante) para detecção da acurácia, valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), especificidade e sensibilidade.....	40
Tabela 5 – Número de UFC/10mL contido nos inóculos (50 µL e 100 µL) de cada isolado H ₂ S _{pos} utilizado no teste de sensibilidade.	41
Tabela 6 – Resultados dos testes H ₂ S, Colilert e membrana filtrante em amostra de água de poço.	50
Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e negativo (NPV) e acurácia do teste H ₂ S com os três meios e os dois volumes analisados em comparação com a membrana filtrante de acordo com os dois micro-organismos indicadores	53
Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e negativo (NPV) e acurácia do teste Colilert em comparação com a membrana filtrante.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Água	14
2.2	Micro-organismos indicadores de contaminação fecal.....	15
2.3	Metodologias para detecção de micro-organismos indicadores de contaminação fecal	17
2.3.1	<i>Tubos múltiplos (Número Mais Provável)</i>	17
2.3.2	<i>Membrana Filtrante</i>	20
2.3.3	<i>Tecnologia de substrato definido</i>	23
2.3.4	<i>Método do H₂S</i>	24
2.4	Normas de avaliação da qualidade da água.....	26
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Preparo das fitas de H ₂ S.....	30
4.2	Isolados utilizados no teste de sensibilidade	31
4.3	Teste de sensibilidade	31
4.3.1	<i>Experimento I e II- Avaliação do efeito da L-cistina sem e com a presença de bactérias H₂S_{neg}</i>	34
4.3.2	<i>Experimento III - Avaliação do efeito da L-cistina mais desoxicolato de sódio</i> . 35	
4.3.3	<i>Leitura do teste H₂S</i>	35
4.3.4	<i>Análise estatística</i>	36
4.4	Análise comparativa da metodologia H ₂ S	38
4.4.1	<i>Amostras de água</i>	38
4.4.2	<i>Detecção de contaminação fecal em amostras ambientais</i>	39
4.5	Análise estatística	39
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	41
5.1	Teste de sensibilidade	41
5.1.1	<i>Concentração dos isolados H₂S_{pos}</i>	41
5.1.2	<i>Efeito da L-cistina na eficácia de detecção dos isolados (experimento I e II)....</i>	41
5.1.3	<i>Efeito da L-cistina com o desoxicolato de Sódio na eficácia de detecção dos isolados (experimento III)</i>	46
5.2	Validação da metodologia H ₂ S com amostras de água de origem ambiental	49
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A água é um composto químico essencial à vida e seu acesso adequado e seguro deve ser garantido a todos. Melhorar o acesso às fontes de água de boa qualidade resulta em benefícios significativos para a saúde humana, animal e para os ecossistemas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Três quartos da superfície da Terra são cobertos por água, dos quais 97% é salgada e constitui os oceanos e 2,7% ou está congelada, ou na forma de vapor ou em lençóis existentes em grandes profundidades, não sendo economicamente viável o seu uso. Desta forma, a água doce disponível para a população do planeta representa apenas 0,3% do total (FUNASA, 2007). O desenvolvimento industrial, o crescimento demográfico e a ocupação do solo têm provocado contaminação desse recurso, comprometendo as fontes hídricas disponíveis para o consumo humano, para fins recreacionais e/ou para o cultivo de alimentos marinhos, aumentando o surgimento de doenças de veiculação hídrica (RIVERA; MARTINS, 1996).

Historicamente, a preocupação com a água como recurso ambiental já existia desde a época dos gregos e romanos, devido à sua importância vital, uma vez que eles já se preocupavam com questões de saneamento para se ter acesso a água não contaminada e evitar doenças (FIORILLO, 2009).

Por conseguinte, a vigilância da qualidade da água para o consumo humano deve ser uma atividade rotineira, preventiva de ação para garantir a saúde da população humana e, para isso, se faz necessária o uso de diferentes metodologias de detecção de contaminação fecal com o intuito de se obter uma maior abrangência territorial. Desta maneira, o presente trabalho visa avaliar a sensibilidade da metodologia H_2S e compará-la com metodologias clássicas de avaliação da qualidade da água

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água

Uma em cada seis pessoas no mundo não tem acesso a fontes de água potável e, destas, a cada cinco pessoas duas vivem na África, ou seja, 325 milhões de pessoas somente no continente africano (WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, 2014). Na América Latina e no Caribe, os países onde se encontra os níveis mais baixos de cobertura no abastecimento de água potável são: República Dominicana, Equador, Haiti, Nicarágua e Peru (WHO; UNICEF, 2014). Entretanto, as estatísticas unificam dados de todo o país, escondendo variações significantes entre as regiões do próprio país (WWAP, 2012).

Outro ponto importante para a manutenção da qualidade da água é o saneamento básico. Ao todo, 46 países têm menos da metade da população com acesso a instalações sanitárias adequadas (WHO; UNICEF, 2014). Até o final de 2011, havia 2,5 bilhões de pessoas sem acesso a instalações sanitárias apropriadas. Destas, 761 milhões usavam locais sanitárias públicas ou compartilhadas, enquanto 693 milhões usavam instalações que não atingiam o padrão mínimo de higiene. O restante (um bilhão) ainda defeca a céu aberto com 71% de áreas rurais (WHO; UNICEF, 2013).

No Brasil, em 2008, 33 municípios ainda não possuíam abastecimento de água e 2495 municípios não tinham acesso a rede coletora de esgoto¹. Deste modo, 18% da população brasileira (34,8 milhões de pessoas) encontrava-se exposta ao risco de contrair alguma doença de veiculação hídrica. Dentre as regiões do Brasil, o Nordeste é a que apresenta o quadro mais grave seguido pela região Norte, em que aproximadamente 15,3 milhões e 8,8 milhões de habitantes sofrem com a falta de coleta de esgoto, respectivamente. (IBGE, 2008).

Nas últimas décadas, os países desenvolvidos atingiram baixas taxas de doenças infecciosas, alto padrão de higiene e alta qualidade de vida devido a recursos abundantes e tecnologia suficientes para ter acesso a excelentes sistemas de distribuição de água e a fontes de águas de boa qualidade (LECHEVALLIER; BUCKLEY, 2007). Mesmo nestes países, em que se verifica alta qualidade da água, com acesso a fontes de água potável, surtos de doenças de veiculação hídrica ainda são reportados (DZIUBAN et al., 2006).

¹No estudo feito pelo IBGE considerou-se que o município tinha rede coletora de esgoto quando esta atendesse pelo menos a um distrito, ou parte dele, independente da extensão da rede, do número de ligações ou de domicílios esgotados.

Se nos países desenvolvidos há surtos de doenças relacionadas com a qualidade da água, a situação dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a distribuição de água é ineficiente ou inexistente e as instalações sanitárias são precárias, é ainda mais alarmante. Mais de dois milhões de pessoas apresentam doenças diarreicas todo ano, dos quais 90% são crianças (LECHEVALLIER; BUCKLEY, 2007).

Os dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, a diarreia também é a segunda causa de morte em crianças menores de cinco anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2014) houveram no Brasil 2.141 mortes vítimas de diarreia. Segundo informações do programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), realizado pelo Ministério da Saúde, entre os anos 2000 a 2011, notificaram-se 33.397.413 casos de doenças diarreicas agudas (DDA) no Brasil. Somente em 2012, já foram registrados 874.768 ocorrências de DDA, das quais: 75.463 em bebês menores de um ano, 196.662 em crianças de um a quatro anos, 98.283 de cinco a nove anos, 495.564 em maiores de 10 anos e 8.796 consideradas ignoradas (causas estas que não foram completamente esclarecidas) (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

2.2 Micro-organismos indicadores de contaminação fecal

As doenças transmitidas pela água são causadas tipicamente pelas bactérias entéricas, as quais infectam o indivíduo por meio de água contaminada por fezes (GRABOW, 1996; GERBA, 2009). A detecção de patógenos que causam tais doenças requer técnicas demoradas e de elevado custo; além disso, alguns patógenos não são detectáveis pelos métodos convencionais. A fim de solucionar essa questão, os programas de monitoramento da qualidade da água utilizam-se de micro-organismos indicadores de contaminação fecal, onde a presença destes micro-organismos indica que bactérias patogênicas podem ser encontradas (GRABOW, 1996). As fezes podem ser fonte de bactérias patogênicas, de vírus, de protozoários e de helmintos (WHO, 2011). Deste modo, não há um micro-organismo indicador de contaminação fecal universal e, sim, alguns indicadores ideais para cada situação (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

O uso de bactérias como indicadores da qualidade microbiológica da água vem desde 1880, quando Von Fritsch descreveu na época que *Klebsiella pneumoniae* e *K. rhinoscleromatis* como micro-organismos constantemente encontrados em fezes humanas (GELDREICH, 1978). Posteriormente, Percy e Grace Frankland realizaram o primeiro exame bacteriológico de rotina, em Londres, a partir do meio com gelatina para contar bactérias,

desenvolvido por Robert Koch (HUTCHINSON; RIDGWAY, 1977). Com o desenvolvimento de meios de cultura semissólidos por Robert Koch e meios de cultura seletivos, como o MacConkey (MACCONKEY, 1905), tornou-se possível a detecção e a descrição de micro-organismos encontrados em fezes, como *Bacillus coli*, descrita em 1885 por Escherich, e depois renomeada como *Escherichia coli* (CASTELLANI; CHALMERS, 1919; SHULMAN; FRIEDMANN; SIMS, 2007), possibilitando o uso de micro-organismos como indicadores da qualidade da água. Com isso, as agências de saúde de diversos países e a Organização Mundial de Saúde passaram a usar esses indicadores como padrão na avaliação da qualidade da água (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2011), para um micro-organismo ser um indicador ideal de contaminação fecal, ele deve: (1) estar presente em grande quantidade no microbioma intestinal de animais de sangue quente e humanos; (2) não se multiplicar em ambientes aquáticos; (3) persistir no ambiente aquático de maneira similar ao do patógeno; (4) estar presente em número maior do que o patógeno; (5) responder de maneira similar ao patógeno no processo de tratamento; e (6) ser detectável por métodos de cultura simples e de baixo custo. Entretanto, uma única bactéria não atende a todos esses critérios. Assim, vários grupos de micro-organismos foram sugeridos.

Em 1914, o serviço de saúde pública dos Estados Unidos aceitou o grupo coliformes totais como um indicador de contaminação fecal para água de consumo (GERBA, 2009). Fazem parte deste grupo espécies de *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que possuem como principal característica a produção de gás durante a fermentação da lactose, após 24-48 horas a 35-37 °C (GRABOW, 1996; ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; MEDEMA, et al., 2003; GERBA, 2009). No entanto, alguns membros dos coliformes totais não são exclusivos de fezes e podem se multiplicar em ambientes aquáticos. De fato, verificou-se um grupo composto por bactérias que produzem gás durante a fermentação de lactose, a uma temperatura de 44,5 °C por 24 horas, denominado coliformes fecais ou coliformes termotolerantes (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; GRABOW, 2006; GERBA, 2009), sendo a *Escherichia coli* seu principal componente. Todavia, espécies de *Klebsiella*, que pertencem ao grupo, foram encontradas em efluentes de fábricas de celulose e de papel, de usinas de processamento têxtil e de usinas de algodão (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986; WHO, 2001).

Em 1986, a Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA) passou a recomendar as bactérias *E. coli* e *Enterococcus* como melhores indicadores de contaminação

em ambientes aquáticos (USEPA, 1986). A Organização Mundial de Saúde também considera a *E. coli* como indicador primário de contaminação fecal em água e alimentos (MEDEMA et al., 2003; WHO, 2011). Esta bactéria é utilizada pois é facilmente distinguida dos outros coliformes termotolerantes (através da detecção da enzima β -glucuronidase) e por não se multiplicar em ambientes aquáticos (GRABOW, 1996; GERBA, 2009). Em 2003, Wade *et al.* sugeriram que *Enterococcus* e, em menor escala, *E. coli* são indicadores adequados na predição de doenças gastrointestinais em ambientes marinhos; enquanto em ambientes de água doce, a *E. coli* apresentou melhor relação entre o indicador e a predição de doenças gastrointestinais.

2.3 Metodologias para detecção de micro-organismos indicadores de contaminação fecal

2.3.1 Tubos múltiplos (Número Mais Provável)

A indicação de coliformes pela técnica de tubos múltiplos, também chamada de técnica do número mais provável, é utilizada há mais de 80 anos como monitoramento da qualidade da água (ROMPRÉ et al., 2002). Em 1908, Phelps descreveu um método para calcular o número de *Bacillus coli* (posteriormente denominada como *Escherichia coli*), através dos resultados dos testes de diluição (tubos múltiplos). A fim de garantir maior precisão, McCrady (1915) discutiu a interpretação numérica dos resultados da técnica de tubos múltiplos e desenvolveu, assim, a tabela a qual é utilizada atualmente na estimativa da concentração de bactérias pela metodologia do número mais provável.

Esta técnica dos tubos múltiplos baseia-se no princípio de que a agitação da amostra pode separar as bactérias, distribuindo-as uniformemente (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2007). Este método se apresenta em três etapas: presuntivo, confirmação e completo (GERBA, 2009). A etapa presuntiva (Figura 1A) consiste em inocular volumes decrescentes da amostra de água após agitação em uma série de tubos contendo meio de cultura adequado ao crescimento do micro-organismo pesquisado, seguido pela inoculação de réplicas (CETESB, 2007; GERBA, 2009; PEPPER; GERBA, 2009). Há vários meios que são utilizados para detecção presuntiva de coliformes, entre eles, o caldo Lactosado e o caldo Lauril Triptose (CETESB, 1993). O resultado é observado pela acidificação do meio com ou sem produção de gás nos tubos após 48 horas de incubação à 35 °C.

(A) Teste Presuntivo

(B) Teste Confirmatório

Selecionar um tubo com produção de gás (Positivo) e inocular em EMB ágar e Endo ágar. Incubar à 35°C por 24 e observar a presença de colônias típicas de coliformes.

Figura 1 – Esquema do funcionamento da metodologia dos tubos múltiplos (número mais provável). Modificado de GERBA, 2009.

Evans et al. (1981) indicaram a presença de bactérias não pertencentes ao grupo coliformes nesses meios utilizados. Desta maneira, todos os tubos com resultado positivo são submetidos a uma segunda etapa: confirmatória (Figura 2B). Existem vários modos e meios que podem ser utilizados nesta fase para verificar a presença de coliformes totais, um deles

ocorre através da transferência de cada cultura positiva no teste presuntivo para o caldo Lactosado com Verde Brilhante e Bile, em que a formação de gás neste meio confirma a presença de coliformes (CETESB, 1993). O meio EC também pode ser utilizado para confirmação de coliformes termotolerantes; o resultado positivo ocorre quando há produção de gás após 24 horas de incubação a 44,5 °C (CETESB, 1993; ROMPRÉ et al., 2002). Além disso, existe também a possibilidade de confirmar a presença de coliformes inoculando um pequeno volume de caldo do tubo considerado positivo no teste presuntivo em uma placa de petri com EMB Ágar (*Levine's eosin-methylene-blue Agar*) ou Endo Ágar. Caso ocorra o crescimento de colônias verdes brilhantes ou com o centro escuro indica que são formadas por bactérias fermentadoras de lactose, confirmando a presença de coliformes (GERBA, 2009).

A última etapa, a completa, se faz necessária apenas em alguns casos e consiste em inocular novamente em caldo Lauril Triptose para verificar se ocorre a acidificação do meio e a produção de gás (GERBA, 2009), podendo também, realizar os testes de oxidase e coloração Gram (CETESB, 1993).

Atualmente, existem meios de cultura que possibilitam a realização da metodologia do número mais provável (NMP) em apenas uma etapa, sem a necessidade de confirmação. Um exemplo é o meio A1 onde a formação de gás indica a presença de coliformes termotolerantes sem a necessidade de confirmação em outros meios (CETESB, 2007).

Um tubo com resultado de positivo na técnica de tubos múltiplos indica que pelo menos um organismo cultivável estava presente na diluição usada para inoculação. Assim, a quantidade de tubos positivos e negativos de cada diluição é utilizada para calcular o número de organismos presentes na amostra original (PEPPER; GERBA, 2009). O resultado é expressado em NMP de micro-organismos presentes por 100 mL. Este número é uma estimativa da média de coliformes presentes na amostra, ou seja, a combinação dos resultados positivos e negativos permite a obtenção da estimativa da densidade através de cálculos de probabilidade (CETESB, 2007). Contudo, a precisão da estimativa é baixa e depende do número de tubos usados na análise (ROMPRÉ et al., 2002).

Algumas variáveis podem dificultar a detecção de coliformes por esta metodologia na etapa presuntiva, principalmente, o crescimento de bactérias não coliformes (EVANS et al., 1981) e a natureza inibitória do meio (MCFETERS; CAMERON; LECHEVALLIER, 1982) subestimando assim, a abundância de coliformes. Logo, esta técnica não apresenta precisão em termos qualitativos e quantitativos (ROMPRÉ et al., 2002).

A técnica de tubos múltiplos é fácil de ser implementada e pode ser realizada por um profissional técnico com conhecimentos básicos em microbiologia, entretanto, o método pode

ser muito trabalhoso, uma vez que muitas diluições necessitam de processamento em cada amostra de água (ROMPRÉ et al., 2002), bem como é menos precisa do que outras metodologias clássicas (PEPPER; GERBA, 2009). Apresenta baixo custo financeiro e não requer equipamentos laboratoriais caros e complexos pois o custo está relacionado apenas com os meios de culturas utilizados.. No entanto, o tempo dispensado para se obter um resultado presuntivo e a necessidade de outras etapas para confirmação pode levar mais de 48 horas no total. Com isso, o método de tubos múltiplos para determinar a concentração dos organismos presentes na água está cada vez mais em desuso na avaliação de fontes de água para consumo.

2.3.2 Membrana Filtrante

Na década de 1940, com o fim da Segunda Guerra Mundial e os centros de abastecimento de água potável em colapso, houve a necessidade de filtros para testar a qualidade da água (BAKER, 2004). Pesquisadores alemães e russos, então, analisaram o uso de filtros com membranas para detecção de micro-organismos e, em 1943, Muller finalmente descreveu o uso desses filtros com membrana utilizando-os em conjunto com um meio seletivo para a detecção de coliformes (FRICKE et al., 2010). Com isso, a partir da década de 1950, a metodologia de membrana filtrante apresentou-se como uma técnica alternativa ao número mais provável para análise de água (WAITE, 1985). Entretanto, somente em 1971, a metodologia de membrana filtrante foi incluída no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, 1971).

Atualmente, a técnica da membrana filtrante é bastante aceita e utilizada no monitoramento da qualidade microbiológica da água de consumo em diversos países (ROMPRÉ et al., 2002). Esta metodologia consiste em filtrar a amostra de água, mediante pressão negativa (vácuo), com o objetivo de reter os micro-organismos na membrana. Após a filtração, a membrana é transferida para uma placa com o meio seletivo que, por capilaridade, entra em contato com a bactéria. Então, a placa é incubada a uma determinada temperatura e, ao final, se for verificado o micro-organismo alvo na amostra, as colônias típicas formadas são contadas (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do funcionamento da técnica de membrana filtrante.

Com o passar dos anos, os aspectos físicos da membrana, a composição dos meios e as condições de incubação foram testadas de acordo com o micro-organismo alvo a fim de obter uma ótima recuperação deste.

Desde o surgimento desta metodologia, a membrana utilizada no processo de filtração foi avaliada em diversos aspectos, entre eles, o método de esterilização utilizado no processo de fabricação e também, sua composição e sua estrutura física (morfologia e tamanho dos poros). Entretanto, o aumento do controle de qualidade e o melhoramento do processo de fabricação eliminou a variação encontrada no início na recuperação dos coliformes quando utilizadas membranas de diferentes lotes e marcas (ROMPRÉ et al., 2002).

Com relação aos meios utilizados na membrana filtrante existe uma grande variedade atualmente. Existem meios o qual necessita-se de testes bioquímicos confirmatórios como, também, meios o qual se precisa de apenas uma etapa.

O meio de cultura mais utilizado na detecção de coliformes totais em amostras de água para consumo é o meio m-ENDO. Bactérias pertencentes a este grupo formam uma colônia vermelha com brilho metálico após 24 h de incubação à 35 °C. Este meio não é totalmente específico para coliformes totais, assim, micro-organismos não pertencentes ao grupo dos coliformes podem crescer formando colônias atípicas vermelhas escuras ou nucleadas sem o

brilho metálico. Também, pode ocorrer a formação de colônias de coliformes totais sem a formação característica de brilho metálico (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION et al., 1998).

Para a realização da contagem de coliformes termotolerantes, APHA, AWWA e WEF (1998) propõem a utilização do meio m-FC com a incubação a uma temperatura de 44,5 °C por 24 horas. Como os coliformes termotolerantes apresentam a capacidade de fermentar lactose a 44,5 °C (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; GERBA, 2009) a elevada temperatura de incubação funciona como agente seletivo juntamente com o ácido rosólico adicionado ao meio. Com isso, há pouco crescimento de bactérias de origem não fecal.

Para realizar a contagem de *E. coli*, sem a necessidade de etapas adicionais de confirmação bioquímica, melhorias nos meios de cultura foram propostas baseadas nas características metabólicas dos coliformes. Assim, passaram a ser utilizados, em meios de cultura, substratos cromogênicos e fluorogênicos que produzem cor e fluorescência, respectivamente, quando hidrolisados por uma enzima específica.

A enzima β -D-glicuronidase está presente em 95% dos isolados de *E. coli* (EDBERG et al., 2000) e a enzima β -galactosidase está presente em todos os coliformes totais (APHA; AWWA; WEF, 1998). Portanto, meios de cultura contendo substratos cromogênicos e fluorogênicos foram desenvolvidos para detectar a presença dessas duas enzimas e, consequentemente, dos coliformes e de *E. coli*. Os meios mI e m-TEC são dois exemplos desse tipo meio de cultura (DIFCO, 1998).

Em 1993, Brenner e colaboradores desenvolveram o meio ágar MI contendo os substratos fluorogênico MUGal (*4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside*) e o cromogênico IBDG (*indoxyl- β -D-glucuronide*) para detectar coliformes totais e *E. coli*, respectivamente e simultaneamente. Desse modo, sob luz natural, as colônias de *E. coli* apresentam coloração azul, enquanto que, sob luz ultravioleta, as colônias típicas dos coliformes totais apresentam fluorescência.

Outro meio de cultura utilizado para detectar *E. coli* é o mTEC modificado por Gaudet, Florence e Coleman (1996) e Ciebin e colaboradores (1995). Ele contém o substrato cromogênico *5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide* o qual é catabolizado em ácido glicurônico e em um composto de coloração vermelha/magenta pela enzima β -D-glicuronidase (USEPA, 2009). Assim, as colônias típicas de *E. coli* revelam esta coloração.

O uso de meios de cultura com substratos cromogênicos e/ou fluorogênicos facilita a detecção de *E. coli* e coliformes totais pela técnica da membrana filtrante, tornando-a mais

rápida e precisa. Todavia, eles são mais caros e não solucionam o problema ligado a presença de indicadores não cultiváveis (ROMPRÉ et al., 2002).

Umas das preocupações sobre a membrana filtrante é a recuperação de micro-organismos estressados ou injuriados. Vários fatores envolvidos no tratamento da água, como a adição de cloro, podem causar danos as bactérias (CAMPER; MCFETERS, 1979) ou aumentar a sensibilidade delas a sais biliares ou a agentes surfactantes contidos em alguns meios seletivos (ROMPRÉ et al., 2002). Assim, a recuperação de bactérias injuriadas apresenta-se melhor em meios não seletivos do que em meio seletivos (BISSONNETTE et al., 1977; MCFETERS; CAMERON; LECHEVALLIER, 1982; SARTORY, 1995). Por isso, alguns meios requerem um pré-enriquecimento em meios não seletivos com o objetivo de recuperar as bactérias injuriadas.

A membrana filtrante caracteriza-se por ser simples, rápida e precisa quando comparada com as metodologias clássicas. Trata-se de metodologia quantitativa, seus resultados são provenientes de contagens diretas. Além disso, apresenta a vantagem de concentrar organismos a partir de grandes volumes de água levando a maiores sensibilidade e confiabilidade (ROMPRÉ et al., 2002).

2.3.3 Tecnologia de substrato definido

Os métodos de tubos múltiplos e de membrana filtrante inibem o crescimento de micro-organismos não pertencentes aos coliformes através de reagentes químicos adicionados ao meio. Ao passo que, as técnicas que utilizam substratos definidos contêm nutrientes específicos somente para o crescimento do micro-organismo alvo, não fornecendo nenhum tipo de substrato à outras bactérias. Portanto, o substrato definido é utilizado como fonte vital para a bactéria alvo e durante sua quebra substratos cromogênicos e fluorogênicos são liberados, indicando a presença do alvo (ROMPRÉ et al., 2002).

Em 1988, Edberg e Edberg propuseram uma metodologia com substrato definido para detecção de coliformes totais e *E. coli* combinando os substratos *ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside* (ONPG) e *4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronide* (MUG). O primeiro substrato detecta a enzima β-galactosidase, presente em todos os coliformes totais e o segundo, específico para *E. coli*. Assim, se o meio se tornar amarelado, a amostra é positiva para coliformes totais. Quando exposta a luz UV, ocorrer a formação da fluorescência azul, então, é positivo para *E. coli*.

Atualmente, diversos testes comerciais baseados na tecnologia do substrato definido foram desenvolvidos: E*Colite (Charm Sciences, Lawrence, Massachusetts, EUA), ReadyCult[®] (Merck, Billerica, Massachusetts, EUA), Colitag[™] (CPI, Palo Alto, California, EUA), Colilert[®] (IDEXX, Westbrook, Maine, EUA), Colilert-18[®] (IDEXX, Westbrook, Maine, EUA) e Colisure[®] (IDEXX, Westbrook, Maine, EUA). Todos são testes de presença e de ausência, porém os três últimos podem ser utilizados como semi-quantitativo (número mais provável), através do Quanti-Tray[®] (IDEXX, Westbrook, Maine, EUA) (FRICKE et al., 2010).

Os testes baseados na tecnologia do substrato definido são fáceis de ser utilizados e apresentam resultado mais rápido e mais preciso quanto a presença dos micro-organismos alvos se comparado com as metodologias clássicas. Esses métodos podem ser mais caros do que os clássicos mas necessitam de menos manuseio durante a análise (ROMPRÉ et al., 2002).

2.3.4 Método do H₂S

Em 1982, Manja, Maurya e Rao observaram que a presença de coliformes na água era associada a presença, também, de organismos produtores de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Além do mais, bactérias entéricas como *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* e algumas cepas de *Klebsiella* também produzem H₂S. Assim, desenvolveram um método de campo simples para detectar presença de micro-organismos de contaminação fecal em água potável baseada na detecção de bactérias produtoras de H₂S indicado pelo escurecimento do meio (MANJA; MAURYA; RAO, 1982).

O meio H₂S é composto originalmente por 20 g de peptona, 1,5 g de dipotássio hidrogenofosfato, 0,75 g de citrato férrico amoniacal, 1 g de tiosulfato de sódio e 1 mL de Teepol em 50 mL de água (MANJA; MAURYA; RAO, 1982). O teste funciona da seguinte forma: a amostra de água é misturada a uma fita que contém o meio de cultura desidratado que é liberado durante a homogeneização. É baseado na redução do tiosulfato de sódio com a formação de sulfeto de hidrogênio que reage com o ferro contido no citrato férrico e forma um precipitado insolúvel de sulfeto de ferro de coloração preta e cheiro forte. Assim, esta técnica não detecta *E. coli* mas sim bactérias associadas à contaminação fecal que reduzem o tiosulfato em H₂S (LUYT et al., 2012; MOSLEY; SHARP, 2005; SOBSEY; PFAENDER, 2002).

Tiosulfato é comumente encontrado no intestino dos mamíferos. Ele é produzido pela oxidação do sulfeto, catalisado pela mitocôndria, a fim de evitar o efeito tóxico do sulfeto. Ademais, o sulfeto é produzido pela redução de sulfatos e sulfitos provenientes da dieta (HILDEBRANDT; GRIESHABER, 2008). Assim, o tiosulfato produzido fica disponível como substrato respiratório para o microbioma intestinal. A capacidade de alguns patógenos entéricos de produzir sulfeto a partir de tiosulfato já é sabido e os gêneros mais comuns de bactérias entéricas que reduzem o tiosulfato são *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* e *Edwardsiella* (TARR, 1934; MANJA; MAURYA; RAO, 1982; JUNG, 2002; STOFFELS et al., 2012). *Salmonella typhimurium* é capaz de reduzir o sulfeto e o tiosulfato em H_2S pelas enzimas tiosulfato reductase e sulfeto reductase (CLARK; BARRETT, 1987; STOFFELS et al., 2012). A respiração pela redução do tiosulfato fornece uma importante vantagem no crescimento e na patogenicidade de espécies de *Salmonella* durante a colonização do intestino (STOFFELS et al., 2012). Qiu e colaboradores (2009) sugerem que *C. freundii* produz sulfeto pela redução dissimilativa de sulfato.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade da técnica H_2S , diversas mudanças foram propostas, tais como: formulação do meio de cultura, modo de preparo do meio (impregnadas em tiras de papel, liofilizadas, somente autoclavadas etc.), volume da amostra (20 mL ou 100 mL), tempo e temperatura de incubação e formato do teste (presença/ausência, número mais provável e membrana filtrante).

Uma modificação na formulação do meio foi adicionar somente o aminoácido L-cistina ao meio H_2S . Em 1994, Venkobachar e colaboradores foram os primeiros a testar a adição deste aminoácido, seguido por outros pesquisadores (GENTHE; FRANCK, 1999; PILLAI et al., 1999; NAIR et al., 2001b; PANT; SARFARAZ; IYENGAR, 2002; PATHAK; GOPAL, 2005).

A adição de L-cistina tem como objetivo aumentar a sensibilidade do meio pois a L-cistina é um aminoácido que contém enxofre em sua composição. Sabe-se que o potencial redox necessário para a redução de sulfato levando a produção de H_2S é menor se comparado com a fermentação bacteriana. Assim, a adição de L-cistina ao meio pode fornecer um ambiente de redução melhor aumentando o crescimento dos micro-organismos e, assim, aumentando a produção de H_2S (VENKOBACHAR et al., 1994).

Outras duas modificações realizadas foram: adição de extrato de levedura (PILLAI et al., 1999; MANJA, 2001) e adição de sais biliares. A adição de extrato de levedura tem o objetivo de aumentar a detecção de *Salmonella* sp. (HU; GIBBS; HO, 1995). Já os sais

biliares atuam inibindo o crescimento de bactérias sulfito redutoras não entéricas (SOBSEY; PFAENDER, 2002; GUPTA et al., 2008; LUYT; MULLER; TANDLICH, 2011).

Com relação a temperatura de incubação, originalmente, o teste foi desenvolvido para ser utilizado em campo à temperatura ambiente (MANJA; MAURYA; RAO, 1982). Entretanto, vários trabalhos testaram a técnica H_2S em várias temperaturas dentro do intervalo de 22-44 °C (CASTILLO et al., 1988, 1994; RATTO; EL-SHAARAWI, 1988; RATTO et al., 1989; KASPAR et al., 1992; GENTHE; FRANCK, 1999; PILLAI et al., 1999; MOSLEY; SHARP; SINGH, 2004; JOHNSON, 2007). A 37 °C, o tempo de incubação é menor quando comparado com outras temperaturas, mas a eficácia do método é independente da temperatura de incubação (RATTO et al., 1989; KASPAR et al., 1992; CASTILLO et al., 1994; PILLAI et al., 1999).

Esta metodologia foi desenvolvida para casos de emergência onde a análise frequente de grandes quantidades de amostras se torna essencial. Além disso, resolve o problema encontrado no campo de falta de equipamento como incubadoras e refrigeradores necessários para realização de outras metodologias (PILLAI et al., 1999).

Além disso, esta técnica não requer elevada capacitação técnica, nem mesmo instalações específicas para ser preparado, podendo assim, ser utilizado em regiões remotas onde não há instalações nem pessoas especializadas para o uso de outros métodos (MANJA; MAURYA; RAO, 1982; MOSLEY; SHARP, 2005; RATTO et al., 1989; VENKOBACHAR et al., 1994).

Destarte, como as metodologias rápidas requerem técnicos e equipamentos caros e específicos, é indispensável o uso de metodologias de baixo custo, simples e eficientes que atinjam áreas que não possuem tais recursos para se obter maior abrangência para verificação da qualidade da água.

2.4 Normas de avaliação da qualidade da água

A autoridade que dirige e coordena a saúde dentro das Nações Unidas e que serve como base para as diretrizes da qualidade da água no mundo é a Organização Mundial da Saúde (OMS). A própria OMS indica que os valores numéricos contidos em suas diretrizes para qualidade da água não têm a pretensão de ser um limite obrigatório a ser seguido pelos outros países membros, mas estes valores são fornecidos como pontos de referência para o desenvolvimento das normas nacionais e regionais da qualidade da água (WHO, 2011). Sendo assim, cada país pode usar estes valores como base para elaborar suas normas de qualidade de

água, podendo ser mais restritivo do que o proposto pela OMS, de acordo com a realidade do país.

Logo, a OMS indica que, para a verificação da qualidade microbiológica da água, nenhuma *E. coli* ou coliformes termotolerantes devem ser detectáveis em 100 mL de amostra de água (WHO, 2011).

Ocorre que, em muitos países, em desenvolvimento e desenvolvidos, há uma grande proporção de sistemas domésticos de captação de água e em pequenas comunidades que não atingem esses valores determinados pelo OMS para água potável. Desta maneira, a OMS propõe que é importante apresentar metas realistas para que melhorias progressivas sejam acordadas e implementadas (WHO, 2011). Neste caso poderia ser estipulada a proporção de amostras negativas para *E. coli* que deveria ser seguida dependendo da qualidade da água que se encontra no sistema de distribuição e do tamanho da população (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplo de alteração nas diretrizes para a avaliação da qualidade da água potável de acordo com a realidade local. Adaptado de WHO, 2011.

Qualidade do sistema de distribuição de água potável ^a	Proporção (%) de amostras negativas para <i>E. coli</i>		
	<5000 de habitantes	5000 – 100000 habitantes	>100000 habitantes
A	90	95	99
B	80	90	95
C	70	85	90
D	60	80	85

^a A qualidade decresce de A a D.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA – sigla em inglês), através do *Safe Drinking Water Act*, define os limites legais de certos contaminantes na água. Através de pesquisas, coletas de dados e outras considerações a EPA desenvolveu a norma *National Primary Drinking Water Regulation* onde, dentre diversos contaminantes químicos e microbiológicos, regulamenta que na água potável não deve ser detectado *E. coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra (USEPA, 2014). Na Europa, também é normatizada para água destinada a consumo humano a ausência de *E. coli* em 100 mL de amostra (EUROPEAN UNION, 1995; NORTH IRELAND ENVIRONMENTAL AGENCY, 2014).

No Brasil, a Portaria MS nº 2.914, publicada em 12 de dezembro de 2011, dispõe nova norma para o monitoramento da qualidade microbiológica da água para o consumo humano e determina a total ausência de *Escherichia coli* em um volume de 100 mL como adequada. Para o Brasil, o cumprimento da norma apresenta-se como um grande desafio, considerando-se que grande parcela da população não possui acesso a água tratada, bem como os métodos

convencionalmente utilizados no controle de qualidade da água não apresentam metodologias rápidas para o monitoramento de *E. coli*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Modificar a formulação do meio H₂S para verificar se altera a eficácia do teste H₂S na detecção de contaminação fecal em ambientes aquáticos e compará-lo com as metodologias clássicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade da técnica H₂S após a adição de L-cistina no meio H₂S na detecção de três isolados produtores de H₂S;
- Avaliar se a adição de desoxicolato de sódio no meio H₂S altera sua sensibilidade na detecção de três micro-organismos produtores de H₂S;
- Testar a sensibilidade da técnica H₂S na presença de bactérias produtoras de H₂S em concentrações menores que 10 UFC/10mL;
- Comparar a técnica H₂S padronizada com a metodologia oficial de membrana filtrante recomendada pela U.S. EPA (*United States Environmental Protection Agency*) e o Colilert® em amostras de campo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo das fitas de H₂S

O meio H₂S foi preparado de acordo com Manja, Maurya e Rao (1982) com duas mudanças em sua composição: adição de L-cistina (nas concentrações: 0 mg/L, 125 mg/L e 250 mg/L) e do sal biliar desoxicolato de sódio (nas concentrações: 0,0 %, 0,1 % e 0,3 %). Estas concentrações de L-cistina, 125 e 250 mg/L, foram sugeridas por Pillai e colaboradores (1999) e Venkobachar e colegas (1994), respectivamente. Enquanto que as concentrações de desoxicolato de sódio foram obtidas após pesquisa no manual de meios de cultura da Difco (DIFCO, 1998) sobre a concentração de desoxicolato de sódio nos meio de cultura seletivos para *Enterobacteriaceae*.

Portanto, este estudo analisou o meio H₂S original bem como as oito modificações provenientes das combinações das concentrações de L-cistina e de desoxicolato de sódio com o meio H₂S (Tabela 2).

Tabela 2. Combinações do meio H₂S com seus respectivos nomes.

Nome	L-cistina	Desoxicolato de Sódio
L000:D00*		0,0%
L000:D01	0 mg/L	0,1%
L000:D03		0,3%
L125:D00	125 mg/L	0,0%
L125:D01		0,1%
L125:D03		0,3%
L250:D00	250 mg/L	0,0%
L250:D01		0,1%
L250:D03		0,3%

* Meio original proposto por Manja, Maurya e Rao (1982)

Assim, o meio L000:D00 foi preparado dissolvendo 40 g de peptona, 3 g de dipotássio hidrogenofosfato (K₂HPO₄), 1,5 g de citrato férrico amoniacal (C₆H₈O₇.xFe₃⁺.yNH₃), 2 g de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) e 2 mL de Teepol em 100 mL de água. Os meios que contêm L-cistina (L125:D_ e L250:D_) e desoxicolato de sódio (L_:D01 e L_:D03) em suas composições foram preparados dissolvendo os mesmo reagentes citados anteriormente mais L-cistina e desoxicolato de sódio nas respectivas concentrações.

Originalmente são necessários 500 μL de meio H_2S para analisar 10 mL de água (MANJA; MAURYA; RAO, 1982). Assim, para o teste de sensibilidade (item 4.3), alíquotas de 500 μL de meio foram absorvidas em tiras de papel filtro de 36 cm^2 . Estas tiras foram então esterilizadas, secadas a 60 $^\circ\text{C}$, inseridas em tubos do tipo falcon com capacidade para 15 mL e guardadas ao abrigo da luz.

Para o teste de validação (item 4.4), onde os volumes de amostra de água analisados foram 20 mL e 100 mL, alíquotas de 1 mL e de 5 mL foram absorvidas em tiras de papel filtro de 70 cm^2 e 360 cm^2 , respectivamente.

4.2 Isolados utilizados no teste de sensibilidade

Para a realização do teste de sensibilidade, três bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio ($\text{H}_2\text{S}_{\text{pos}}$) foram utilizadas. Foram elas: *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii*.

O teste de sensibilidade foi realizado de três formas distintas. Em duas delas, a eficácia dos nove meios na detecção do micro-organismo produtor de H_2S foi testada frente a adição de bactérias não produtoras de H_2S ($\text{H}_2\text{S}_{\text{neg}}$) que são comumente encontradas amostras de água contaminada com o objetivo de analisar se as bactérias $\text{H}_2\text{S}_{\text{neg}}$ seriam capazes de inibir ou diminuir a sensibilidade do teste.

Portanto, os isolados $\text{H}_2\text{S}_{\text{neg}}$ utilizados foram: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*. Os dois primeiros foram escolhidos por serem de origem fecal e Gram negativos; *E. faecalis*, por ser Gram positivos e de origem fecal; e, *B. subtilis* foi escolhido por ser Gram positivo mas também por ser encontrado no solo e, consequentemente, em amostras de água.

Todos os isolados utilizados fazem parte da coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade de São Paulo.

4.3 Teste de sensibilidade

Para testar a sensibilidade da metodologia H_2S , diluições com quantidades conhecidas de bactérias produtoras de H_2S ($\text{H}_2\text{S}_{\text{pos}}$) foram avaliadas frente aos nove meios propostos com o objetivo de saber qual deles melhor detecta a presença destes micro-organismos nas concentrações: $<15 \text{ UFC}/10\text{mL}$ e entre 10 a 40 $\text{UFC}/10\text{mL}$.

Para isso, o teste de sensibilidade foi dividido em três experimentos (I, II e III). Eles divergem uns dos outros quanto a presença na amostra de água de bactérias não produtoras de H_2S (H_2S_{neg}) e quanto aos meios H_2S avaliados, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Meios analisados e bactérias utilizadas em cada um dos experimento do teste de sensibilidade.

Experimento	Meios analisados	Bactérias H_2S_{neg}
I	L000:D00; L125:D00; L250:D00	Nenhuma
II	L000:D00; L125:D00; L250:D00	Somente Gram negativas (<i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i>)
III	Todos	Gram negativas (<i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i>) e Gram positivas (<i>E. faecalis</i> e <i>B. subtilis</i>)

Assim, com relação aos meios avaliados, os dois primeiros experimentos (I e II) testaram o meio original (L000:D00) e os dois meios com L-cistina em sua composição sem o desoxicolato de sódio (L125:D00 e L250:D00) enquanto no terceiro experimento (III) foram avaliados todos os meios propostos neste estudo.

No que se refere a presença de bactérias H_2S_{neg} , avaliou-se a eficácia dos nove meios em detectar os micro-organismos H_2S_{pos} em 10 mL de água da seguinte forma: o experimento I não continha micro-organismos H_2S_{neg} (Figura 3-I); já o experimento II, dois micro-organismos H_2S_{neg} (Gram negativos) foram adicionados (Figura 3-II); e, no experimento III, os 10 mL de água foram acrescidos de quatro bactérias H_2S_{neg} (duas Gram negativa e duas Gram positiva) (Figura 3-III).

A presença dos micro-organismos H_2S_{neg} nos experimentos II e III tem como objetivo verificar se a presença destes interferem na sensibilidade do teste. Como o desoxicolato de sódio é um sal biliar e sua utilização no meio de cultura tem a finalidade de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas, somente no experimento III foram utilizadas bactérias Gram positivas e foram avaliados os meios acrescidos de desoxicolato de sódio (L__ :D01 e L__ :D03).

Figura 3 – Esquema geral dos três experimentos realizados no teste de sensibilidade

Apesar do teste de sensibilidade ser dividido em três experimentos, de uma maneira geral, todos eles foram realizados da seguinte forma (Figura 4):

- A. Primeiramente, os isolados H_2S_{pos} foram semeados em placas de petri com ágar LB. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37 °C (Figura 4A);
- B. Após este período, uma colônia de cada isolado foi removida e inoculada em caldo LB (Difco™) e incubada a 37 °C até atingir a densidade óptica (625nm) de 0,200 (Figura 4B);
- C. Então, foi realizada a diluição seriada (decimal) em água de diluição até 10^{-5} (Figura 4C);
- D. (1) 50 e 100 μ L da diluição 10^{-5} foram inoculados nos tubos contendo as fitas impregnadas com cada meio H_2S proposto (Figura 4D);
(2) Os mesmos volumes foram semeados em placa contendo ágar LB pelo método de espalhamento em superfície usando pérolas de vidro esterilizadas para determinar o número de unidade formadora de colônia (UFC) existentes nestes inóculos (Figura 4D);
- E. Para a leitura dos resultados, os tubos foram incubados a uma temperatura de 35 °C por até 72 horas (Figura 4E).

Figura 4 – Esquema do teste de sensibilidade.

4.3.1 Experimento I e II- Avaliação do efeito da L-cistina sem e com a presença de bactérias H_2S_{neg}

Como demonstrado no esquema geral do teste de sensibilidade (item 4.3), os isolados H_2S_{pos} após serem cultivados em LB eles foram semeados em placa com ágar LB e inoculados nos tubos com as fitas de H_2S . Este plaqueamento em ágar LB foi realizado em triplicata e, assim, a contagem de cada placa de um mesmo micro-organismo variou. Logo, a concentração de cada isolado foi representada como um intervalo (Tabela 4).

Cada um dos três meios utilizados nestes dois experimentos foi avaliado quanto a sensibilidade na detecção dos isolados em duas concentrações. No experimento II, a bactérias H_2S_{neg} Gram negativas foram utilizadas na concentração final de 10^6 UFC/10mL.

Os testes foram repetidos 17 vezes para fins estatísticos (Figura 5) e as leituras foram realizadas nos tempos 18, 24, 36, 48, 60 e 72 horas.

Figura 5 – Modelo experimental dos ensaios I e II do teste de sensibilidade.

4.3.2 Experimento III - Avaliação do efeito da L-cistina mais desoxicolato de sódio

A execução deste ensaio foi realizada de acordo com os experimento I e II (item 4.3.1) porém com a diferença de que todos os nove meios propostos neste estudo foram avaliados (Figura 6). Assim como no experimento II, as bactérias H_2S_{neg} (Gram negativas e positivas) foram utilizadas na concentração final por tubo de 10^6 UFC/10mL.

Figura 6 – Modelo experimental do experimento III do teste de sensibilidade.

4.3.3 Leitura do teste H_2S

A metodologia de H_2S é baseada na formação de um precipitado de sulfeto de ferro, de coloração preta, como resultado da reação do sulfeto de hidrogênio com o ferro encontrado no tiosulfato de sódio presente no meio. Assim, a coloração do meio torna-se preta a medida que os micro-organismos produtores de sulfeto de hidrogênio realizam esta reação indicando, então, a presença de micro-organismos produtores de H_2S e, consequentemente, bactérias de origem fecal. Exclusivamente, para o teste de sensibilidade, a intensidade do sinal foi registrado como na Figura 7.

Figura 7 – Escala de cor utilizada para leitura dos resultados do H₂S. (1) Negativo; (2) a (6) Positivos.

4.3.4 Análise estatística

Para comparar quantitativamente as sensibilidades dos nove meios, foi adotado o procedimento estatístico descrito abaixo.

Como os experimentos foram realizados sobre controles positivos, a ampla maioria das amostras ficou positiva em até 72h (ver Seção 5.1). Dessa forma, a medida de sensibilidade de cada meio não foi baseada na proporção de amostras positivas, mas no tempo necessário para que as amostras ficassem positivas. Logo, meios com tempos médios menores são considerados mais sensíveis.

Para testar a significância das diferenças entre os tempos médios obtidos nos diferentes meios, adotou-se o teste de aleatorização de Fisher-Pitman, implementado no pacote *coin* (Hothorn et al., 2006) do ambiente R (R Core Team, 2016). Dados os conjuntos de observações de duas populações ou experimentos (cujas distribuições são desconhecidas), este teste avalia a hipótese nula de igualdade das médias das distribuições. O teste prescinde da necessidade de amostras grandes ou de distribuição normal dos dados sendo, portanto, mais robusto do que os testes clássicos t de Student ou Análise de Variância, mas assume a premissa de que as formas das distribuições comparadas são iguais.

Para cada par de meios A e B, suponha que os dados sejam organizados em uma sequência $x_1, x_2, \dots, x_{n_A}, x_{n_A+1}, x_{n_A+2}, \dots, x_{n_A+n_B}$, onde n_A e n_B denotam as quantidades de amostras nos meios A e B, $x_1, x_2, \dots, x_{n_A}$ denota os tempos no meio A e $x_{n_A+1}, x_{n_A+2}, \dots, x_{n_A+n_B}$ denota os tempos no meio B.

O procedimento pode ser descrito pelos passos abaixo:

- a) Calcule as médias $m_1 = (x_1 + x_2 + \dots + x_{n_A})/n_A$ e $m_2 = (x_{n_A+1} + x_{n_A+2} + \dots + x_{n_A+n_B})/n_B$; calcule a diferença entre as médias:

$$d = m_1 - m_2$$
- b) Para cada valor de $i=1,2,\dots,10.000$:
 - b1) Gere uma permutação aleatória dos dados, denotada por

$$x_1^{(i)}, x_2^{(i)}, \dots, x_{n_A}^{(i)}, x_{n_A+1}^{(i)}, x_{n_A+2}^{(i)}, \dots, x_{n_A+n_B}^{(i)}$$

Essa permutação consiste essencialmente dos mesmos dados originais, porém em uma ordem aleatória. Note que, nesse caso, com alta probabilidade haverá observações do meio B no subconjunto $x_1^*, x_2^*, \dots, x_{n_A}^*$, e observações do meio A no subconjunto $x_{n_A+1}^*, x_{n_A+2}^*, \dots, x_{n_A+n_B}^*$. O sobrescrito (i) denota apenas que essa permutação é específica da i – ésima repetição.

b2) Calcule as médias $m_1^{(i)} = (x_1^{(i)} + x_2^{(i)} + \dots + x_{n_A}^{(i)})/n_A$ e $m_2^{(i)} = (x_{n_A+1}^{(i)} + \dots + x_{n_A+n_B}^{(i)})/n_B$, e a respectiva diferença: $d^{(i)} = m_1^{(i)} - m_2^{(i)}$.

c) Calcule a proporção de vezes em que o valor absoluto de $d^{(i)}$ é maior do que o valor absoluto de d :

$$p = \frac{\# \text{ casos em que } \text{abs}(d^{(i)}) > \text{abs}(d)}{10.000}$$

A estatística p é denominada p-valor empírico, e tem a mesma interpretação do p-valor nos testes clássicos tradicionais. Se a hipótese for verdadeira (ou seja, os tempos médios nos meios A e B são iguais), então as diferenças entre as médias calculadas com os dados “misturados” dos dois meios não deverão ser muito diferentes da diferença original, e p deverá ser elevado. Por outro lado, se a hipótese for falsa (os tempos médios são diferentes), então as diferenças computadas sobre os dados misturados deverão ser menores do que a diferença original e, portanto, p deverá ser baixo. Neste trabalho, considerou-se que, quando $p < 0,05$, há uma baixa evidência da hipótese de que as médias são iguais e, portanto, a hipótese é rejeitada.

Esse método permite que os tempos nos meios sejam comparados entre dados organizados em blocos, como por exemplo amostras com diferentes concentrações iniciais. Se houver o efeito de bloco, ou seja, se o tempo de uma amostra se ficar positiva for dependente da concentração inicial, então as diferenças $d^{(i)}$ tenderão a ser elevadas se a proporção de amostras proveniente das concentrações mais altas no subconjunto $x_1^{(i)}, x_2^{(i)}, \dots, x_{n_A}^{(i)}, x_{n_A+1}^{(i)}$ for diferente da proporção no subconjunto $x_{n_A+1}^{(i)}, x_{n_A+2}^{(i)}, \dots, x_{n_A+n_B}^{(i)}$. Para evitar esse problema, basta garantir que, em cada iteração do método acima, as quantidades de amostras de cada bloco

(concentração inicial alta/concentração inicial baixa) nos dois subconjuntos sejam iguais às quantidades conjuntos originais $x_1, x_2, \dots, x_{n_A}$ e $x_{n_{A+1}}, x_{n_{A+2}}, \dots, x_{n_A+n_B}$.

4.4 Análise comparativa da metodologia H₂S

A metodologia H₂S, a mesma foi comparada com técnicas da membrana filtrante e Colilert[®].

4.4.1 Amostras de água

Para a validação da metodologia H₂S, amostras de água de poço foram coletadas no campus Cidade Universitária – USP em São Paulo, SP. Foram oito amostras analisadas (Figura 8). Destas, cinco são de poços com menos de 200 metros de profundidade e que estão em processo de reativação pela prefeitura da USP para sua utilização no abastecimento de água do campus (A). Os outros três poços são de monitoramento da bacia e possuem menos de 10 metros de profundidade (B).

Figura 8 - Localização dos poços dentro do campus Cidade Universitária – USP (A1 a A5 – poços em processo de reativação para consumo; B6 a B8 – poços de monitoramento da bacia).

4.4.2 Detecção de contaminação fecal em amostras ambientais

A metodologia de membrana filtrante foi realizada de acordo com as normas técnicas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB e da Agência Ambiental Americana – U.S. EPA. Para a detecção de *E. coli* e coliformes totais foi utilizada o método 1604 (USEPA, 2002).

Coliformes totais e *E. coli* também foram analisados pela técnica de Colilert™ seguindo as instruções da companhia IDEXX.

As fitas de H₂S foram preparadas de acordo com o item 4.1 nas seguintes configurações: o meio original (L000:D00), o meio com 250 mg/L de L-cistina (L250:D00) e o meio com 0,3% de desoxicolato de sódio (L0:D3). O meio original foi utilizado para fins de comparação com o meio L0:D3. O meio L250:D00 também foi incluído no teste pois é o meio mais utilizado na literatura após o original.

Dois volumes foram utilizados na técnica H₂S: 20 e 100 mL. O primeiro é o volume proposto por Manja e colaboradores (1982) e o segundo foi escolhido pois é o volume indicado para análise de água para consumo humano. Os testes foram incubados a temperatura ambiente e as leituras foram realizadas em 24 e 48 horas registrando o resultado como positivo e negativo.

4.5 Análise estatística

Para comparação das metodologias H₂S e Colilert com a membrana filtrante, foi calculado a especificidade, a sensibilidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e a acurácia segundo Tabela 4. A sensibilidade é a capacidade do teste em detectar a presença real do micro-organismos e a especificidade é a capacidade de detectar a ausência real da bactéria. Valor preditivo positivo e negativo é a proporção realmente positiva e negativa entre todos os resultados positivos e negativos respectivamente. Já a acurácia determina a eficiência do teste em determinar o verdadeiro resultado.

Tabela 4 – Comparação de duas técnicas (H₂S ou Colilert com membrana filtrante) para detecção da acurácia, valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), especificidade e sensibilidade

		Membrana Filtrante	
		Positivo	Negativo
H ₂ S/Colilert	Positivo	(a) Positivo	(b) Falso Positivo
	Negativo	(c) Falso Negativo	(d) Negativo
Sensibilidade = $[a/(a+c)] \times 100$			PPV = $[a/(a+b)] \times 100$
Especificidade = $[d/(d+b)] \times 100$			NPV = $[d/(d+c)] \times 100$
Acurácia = $[a+d/(a+b+c+d)] \times 100$			

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Teste de sensibilidade

5.1.1 Concentração dos isolados H_2S_{pos}

Neste estudo, a sensibilidade do método H_2S foi avaliada frente aos nove meios propostos. Para isso, utilizou-se de duas concentrações, uma baixa (C1) e outra mediana (C2), dos três isolados H_2S_{pos} analisados com o objetivo de avaliar a eficácia do método na detecção destas bactérias H_2S_{pos} . Assim, as concentrações utilizadas em cada um dos três isolados se encontra na Tabela 5.

Tabela 5 – Número de UFC/10mL contido nos inóculos (50 μ L e 100 μ L) de cada isolado H_2S_{pos} utilizado no teste de sensibilidade.

Bactérias H_2S_{pos}	Concentrações (UFC/10mL)	
	C1 (50 μ L)	C2 (100 μ L)
<i>Citrobacter freundii</i>	08 - 18	30 - 36
<i>Proteus mirabilis</i>	01 - 04	10 - 16
<i>Salmonella typhimurium</i>	07 - 15	27 - 36

5.1.2 Efeito da L-cistina na eficácia de detecção dos isolados (experimento I e II)

No experimento I, somente com as presenças dos isolados H_2S_{pos} , foi observado que *P. mirabilis* foi detectado nos dois meios com L-cistina e pelo meio original (L000:D00, L125:D00 E L250:D00) igualmente após 18 horas de incubação, nas duas concentrações testadas (1-4 UFC/10mL e 10-16 UFC/10mL) ($p=1$), indicando que a adição de L-cistina não alterou a sensibilidade (Figura 9).

Quando analisou-se o experimento I com a bactéria *S. typhimurium*, foi percebido que, de um modo geral, nem todos os meios foram capazes de detectá-la até 72 horas (Figura 10). Do total de 102 tubos avaliados apenas 5 não foram positivos (4,9% falsos positivos), destes 3 continham o meio com 250 mg/L de L-cistina (L250:D00). Uma possível explicação é que quanto mais baixa a concentração do micro-organismo de origem fecal na amostra de água analisada maior é o tempo de incubação necessário até a metodologia H_2S ser capaz de detectá-lo (PILLAI et al., 1999). Não houve diferença significativa no tempo de detecção de *S. typhimurium* entre os três meios analisados ($p=1$).

Figura 9 – Número de repetições do teste com *P. mirabilis* (experimento I) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18 h e 24 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *P. mirabilis* (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).

Figura 10 – Número de repetições do teste com *S. typhimurium* (experimento I) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24, 36, 48, 60 e 72 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *S. typhimurium* (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).

Com relação ao *C. freundii* no experimento I, observou-se que os meios L000:D00 e L125:D00 tiveram o tempo de detecção parecidos ($p=1$), no entanto, mais eficientes do que o meio L250:D00 ($p<0,05$) que revelou-se positivo somente após 36 horas em ambas concentrações medidas (8 - 18 e 30 - 36 UFC/mL) (Figura 11).

Figura 11 – Número de repetições do teste com *C. freundii* (experimento I) que apresentaram resultado positivo forte (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *C. freundii* (8 - 18 e 30 - 36 UFC/mL).

Quanto a presença de bactérias H_2S_{neg} (experimento II), com exceção do ensaio com *S. typhimurium* que apresentou resultado positivo mais rápido (36 horas) na presença dos micro-organismos H_2S_{neg} em comparação com o experimento I (72 horas), os testes com *C. freundii* e *P. mirabilis* necessitaram de mais tempo até se revelarem positivos (Figura 12, 13 e 14). Genthe e Franck, em 1999, realizaram testes com *Proteus vulgaris* em diferentes concentrações na presença de *Salmonella typhi* e *E. coli*. Eles verificaram que a presença destes micro-organismos H_2S_{neg} não diminuiu a sensibilidade do teste mas aumentou o tempo de resposta. Apesar de todos os ensaios com *C. freundii* apresentarem resultados positivos no mesmo tempo de incubação nos experimentos I e II (36 horas), no segundo notou-se maior demora para detectá-lo inicialmente em ambas concentrações (Figura 14). Em relação aos ensaios com *P. mirabilis*, foi necessário mais 12 horas de incubação para que todos revelassem positivos (Figura 12), corroborando com os resultados encontrados no trabalho de Genthe e Franck (1999).

Quanto aos meios utilizados no experimento II, nos três isolados testados verificou-se que o meio original (L000:D00) foi o mais sensível ($p<0,05$), ou seja, *C. freundii*, *P. mirabilis* e *S. typhimurium* foi detectado mais rapidamente em ambas concentrações. Nos três ensaios podemos ver claramente isto e em ambas as concentrações analisadas. Com *P. mirabilis*, o

meio L000:D00 se apresentou positivo já na primeira leitura efetuada (18 horas) (Figura 12). Nos casos de *S. typhimurium* e *C. freundii*, o meio original foi o que mais obteve repetições com resultado positivo entre os três meios (Figura 13 e 14).

Figura 12 – Número de repetições do teste com *P. mirabilis* mais *E. aerogenes* e *E. coli* a 10^6 UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultados positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *P. mirabilis* (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).

Figura 13 – Número de repetições do teste com *S. typhimurium* mais *E. aerogenes* e *E. coli* a 10^6 UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultados positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *S. typhimurium* (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).

Nos testes com a presença apenas dos micro-organismos H_2S_{pos} , nenhum meio analisado se mostrou significativamente mais sensível. Entretanto, nos ensaios com *C. freundii*, os meios L000:D00 e L125:D00 se mostraram mais eficientes se comparado com o meio L250:D00 ($p < 0,05$) embora, entre eles, não houvesse diferença significativa ($p = 1$). Assim, na maioria dos ensaios do experimento I, os meios acrescidos de L-cistina se mostraram tão sensíveis quanto o meio original. Entretanto, o meio com 250 mg/L de L-cistina se mostrou um pouco menos sensível do que os outros dois.

Figura 14 – Número de repetições do teste com *C. freundii* mais *E. aerogenes* e *E. coli* a 10^6 UFC/10mL (experimento II) que apresentaram resultado positivo (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L125:D00 e L250:D00) e a concentração utilizada de *C. freundii* (8 - 18 e 30 - 36 UFC/mL).

Muitos trabalhos avaliaram a sensibilidade do meio H_2S com L-cistina à 250mg/L (VENKOBACHAR et al., 1994; GENTHE; FRANCK, 1999; PANT; SARFARAZ; IYENGAR, 2002; PATHAK; GOPAL, 2005; TAMBEKAR et al., 2007). Destes trabalhos, somente Venkobachar e colaboradores (1994) compararam o meio com L-cistina e original proposto por Manja e colaboradores (1982), mostrando que o meio modificado reduziu o tempo de detecção de contaminação fecal e que também aumentou a sensibilidade.

Dois trabalhos analisaram o meio H_2S com a concentração de L-cistina em 125 mg/L (PILLAI et al., 1999; ROSER et al., 2005). Pillai e colaboradores (1999) testaram três diferentes meios: (1) original proposto por Manja e colaboradores (1982), (2) com 125 mg/L de L-cistina e (3) acrescido de 5 g de extrato de levedura e com a peptona reduzida para 15 g. Ele analisou os três meios na presença de contaminantes fecais provenientes de fezes diluídas em laboratório e, concluiu que a amostras de água com baixas concentrações de micro-organismos fecais e com uma baixa temperatura a adição de L-cistina ao meio melhora a sensibilidade do teste. Já Roser e colaboradores (2005) avaliaram o teste H_2S modificado com outras metodologias, sem compará-lo com o meio original, concluindo que o teste H_2S se mostrou mais sensível que a contagem de protozoários e colifagos.

Nenhum trabalho anterior avaliou a sensibilidade do teste H_2S frente a diferentes concentrações de L-cistina, analisando somente uma das concentrações. Os resultados deste estudo mostraram que o meio original e os meios com L-cistina apresentaram a mesma sensibilidade na detecção dos isolados *C. freundii*, *P. mirabilis* e *S. typhimurium* sozinhos. Quando avaliados na presença de bactérias H_2S_{neg} , o meio original foi mais sensível. Assim, a adição L-cistina não se faz necessária.

5.1.3 Efeito da L-cistina com o desoxicolato de Sódio na eficácia de detecção dos isolados (experimento III)

No experimento III, o qual apresentava quatro bactérias H_2S_{neg} , sendo duas delas sensíveis a ação do desoxicolato de sódio, observou-se que o isolado *P. mirabilis* foi detectado pelos nove meios após 18 horas de incubação (Figura 15), nas duas concentrações estudadas (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL), indicando que adição de L-cistina e desoxicolato de sódio foi igualmente sensível ao meio original ($p=1$).

Figura 15 – Número de repetições do teste com *P. mirabilis* mais *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis* e *B. subtilis* a 10^6 UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18 e 24 h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03, L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de *P. mirabilis* (1 - 4 e 10 - 16 UFC/mL).

No que se refere a bactéria *S. typhimurium* durante o experimento III, após 24 horas, percebeu-se que praticamente todos os meios avaliados já se apresentavam positivos com exceção de um tubo nos meios L000:D00, L000:01, L125:D03 e L250:D01 na menor

concentração estudada (7 - 15 UFC/10mL). Entretanto, todos se revelaram positivos após 36 horas de duração do ensaio (Figura 16).

Figura 16 – Número de repetições do teste com *S. typhimurium* mais *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis* e *B. subtilis* a 10⁶ UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03, L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de *S. typhimurium* (7 - 15 e 27 - 36 UFC/mL).

Com o micro-organismo *C. freundii*, notou-se que o meio L000:D03 foi o único a apresentar resultado positivo com 18 horas. No total foram oito tubos sendo cinco na concentração mais baixa e três na concentração mediana (Figura 17). Na leitura de 24 horas, este meio já apresentou todos os resultados positivos para a presença de *C. freundii* em ambas

as concentrações, resultado também observado para o meio L125:D03 mas somente na concentração mediana. Observou-se, ainda, que o meio L250:D00 foi o que menos revelou-se positivo com 24 horas (três tubos). Todavia, após 36 horas de ensaio, todos os meios ficaram positivos (Figura 17). Portanto, o meio L000:D03 se mostrou mais sensível do que o meio original e os demais propostos ($P < 0,05$).

Figura 17 – Número de repetições do teste com *C. freundii* mais *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis* e *B. subtilis* a 10^6 UFC/10mL (experimento III) que apresentaram resultados positivos forte (++) , positivo médio (+) e negativo (-) de acordo com o tempo decorrido (18, 24 e 36 h), o meio analisado (L000:D00, L000:D01, L000:D03, L125:D00, L125:D01, L125:D03, L250:D00, L250:D01 e L250:D03) e a concentração utilizada de *C. freundii* (8-18 e 30-36 UFC/mL).

Sobsey e Pfaender (2002) sugeriram que a inclusão de sais biliares no meio de cultura é uma prática muito comum para inibir o crescimento de micro-organismos extra-intestinais, pois, o microbioma intestinal de humanos e de animais são mais tolerantes estes reagentes. Assim, muitos meios de cultura destinados para identificação de *Enterobacteriaceae* se utilizam deste reagente para inibir crescimento de outros micro-organismos. Sobsey e Pfaender (2002) indicam, também, a inclusão de 0,5% de sais biliares para eliminar bacilos, arqueobactérias e outros micro-organismos presentes no solo. Entretanto, em testes preliminares (dados não mostrados) observou-se que esta concentração de desoxicolato de sódio apresentava pior taxa de detecção de contaminantes fecais.

Genthe e Franck (1999) mostraram que o teste H₂S apresentava dificuldade em detectar contaminantes fecais quando a concentração de coliformes fecais na água era menor do que 10 UFC/100mL. O desafio de todas as metodologias de detecção de micro-organismos indicadores de contaminação fecal é a detecção em amostras de água com baixa concentração da bactéria alvo. Assim, Luyt, Muller e Tandlich (2011), verificaram que com a adição de desoxicolato de sódio (0,5%) ao meio H₂S aumentou para 64% a taxa de detecção de contaminação fecal em amostras com a concentração de 0 a 10 UFC/100mL de *E. coli*. No presente trabalho, o meio com 0,3% de desoxicolato de sódio (L000:D00) foi o mais sensível corroborando, em parte, com o estudo de Luyt, Muller e Tandlich (2011), pois a concentração reportada foi diferente.

Outros trabalhos também utilizaram sais biliares no meio H₂S substituindo o Teepol pelo sal biliar, no entanto, eles não especificaram qual sal biliar foi empregado na formulação (TAMBEKAR; HIRULKAR, 2007; GUPTA et al., 2008; TAMBEKAR; GULHANE; BANGINWAR, 2008).

5.2 Validação da metodologia H₂S com amostras de água de origem ambiental

Das oitos amostras de água de poço coletadas, cinco eram provenientes de poços recém reformados e, destes, três se encontravam em processo de outorga no Departamento de Águas e Energia Elétrica do estado de São Paulo para seu uso no abastecimento do campus Cidade Universitária “Armando Salles de Oliveira” – USP e possuíam bomba para captar a água. Os outros três poços avaliados foram construídos com o objetivo de monitorar a bacia hidrográfica onde o campus se encontra e não possuíam bomba para captação de água.

Dos poços utilizados para abastecimento (A1-A5) apenas um (A5) foi positivo para *E. coli* pela técnica de membrana filtrante, ao passo que, quatro apresentaram contagem para

coliformes totais. Enquanto que os poços de monitoramento apresentaram contagem para *E. coli* e coliformes totais em dois (B2 e B3) dos três analisados (Tabela 6).

Com relação ao Colilert, apenas dois poços foram positivos para *E. coli* sendo que, em um deles (A3), não houve contagem de *E. coli* pela técnica da membrana filtrante (falso positivo). Dos seis resultados negativos, dois apresentaram contagem para *E. coli* indicando serem falsos negativos (A5 e B8) (Tabela 6).

Pela metodologia H₂S, a utilização de 100 mL de amostra se mostrou mais consistente entre os meios do que as análises realizadas com 20 mL pois todos os três meios analisados tiveram 100% de compatibilidade, ou seja, quando um se apresentava negativo ou positivo os outros dois também se mostravam positivo ou negativo, o que não ocorreu com os testes com 20 mL de amostra.

Assim, foi observado que (Tabela 6):

- A amostra A1 e A4, a técnica H₂S com 100 mL apresentou resultado positivo enquanto que a contagem em placa (membrana filtrante) não indicou a presença de *E. coli* (falso positivo) mas indicou a presença de 26 e 2 UFC/100mL, respectivamente, de coliformes totais enquanto que, o teste com 20 mL, apenas o meio L000:D00 foi positivo na amostra A1;
- O poço A5 apresentou contagem em placa para *E. coli* e coliformes totais mas não revelou-se positivo para o teste H₂S.
- O meio L000:D03 foi o único a não ficar positivo nos poços B7 e B8 no teste com 20 mL de amostra.

Tabela 6 – Resultados dos testes H₂S, Colilert e membrana filtrante em amostra de água de poço.

Poço	H ₂ S (20mL)			H ₂ S (100mL)			Colilert		Membrana Filtrante	
	L000:D00	L000:D03	L250:D00	L000:D00	L000:D03	L250:D00	E. coli	CT	E. coli	Coliformes Totais
A1	+	-	-	+	+	+	-	+	<1 UFC/100mL	2,6x10 ¹ UFC/100mL
A2	-	-	-	-	-	-	-	+	<1 UFC/100mL	3 UFC/100mL
A3	-	-	-	-	-	-	+	+	<1 UFC/100mL	<1 UFC/100mL
A4	-	-	-	+	+	+	-	+	<1 UFC/100mL	2 UFC/100mL
A5	-	-	-	-	-	-	-	+	3 UFC/100mL	>8,0x10 ¹ UFC/100mL
B6	-	-	-	-	-	-	-	-	<1 UFC/100mL	<1 UFC/100mL
B7	+	-	+	+	+	+	+	+	2,6x10 ¹ UFC/100mL	Presente*
B8	+	-	+	+	+	+	-	+	1,0x10 ¹ UFC/100mL	>2,0x10 ¹ UFC/100mL

* - crescimento confluyente, impossível de quantificar

A - Poços em processo de reativação para abastecimento

B - Poços de monitoramento da bacia

CT - Coliformes Totais

Com relação ao volume do teste H₂S, originalmente foi proposto que 20 mL de amostra como o suficiente para esta metodologia detectar presença de micro-organismos de

origem fecal (MANJA; MAURYA; RAO, 1982). Alguns trabalhos mudaram este volume para 100 mL com o objetivo de torna-lo comparável com os métodos padronizados que analisam 100 mL de amostra de água (CASTILLO et al., 1994; MARTINS; CASTILLO; DUTKA, 1997; PILLAI et al., 1999; NAIR et al., 2001a, 2001b). Manja e colaboradores (2001) comparou o teste H₂S nos volumes 20, 55 e 100 mL de amostra e demonstrou que não houve diferença significativa entre eles. Nossos resultados não corroboram com Manja e colegas (2001) pois houve uma discrepância de resultados entre os diferentes volumes o qual 100 mL mostrou ser mais consistente. No entanto, uma possível explicação para essa diferença consiste em que nos testes com 100 mL de amostra de água, há uma maior probabilidade de detecção de micro-organismos em baixa concentração. Por exemplo, o poço A4 todos os meios H₂S revelaram-se positivos nos testes com 100 mL e negativos nos ensaios com 20 mL e não apresentaram contagem de *E. coli* porém, obteve contagem de coliformes totais em baixa concentração (2 UFC/100mL).

Em referência aos falsos positivos e negativos, apesar de poucas amostras estudadas, resultados desses dois tipos foram verificados. Nos dois casos relatados de falso positivo (Tabela 6) o critério utilizado foi resultado positivo pela técnica H₂S e ausência de *E. coli* pela metodologia da membrana filtrante. Entretanto, em ambos os casos relatados neste estudo, houve contagem de coliformes totais, grupo o qual faz parte os micro-organismos produtores de H₂S de origem fecal. Outra explicação para a presença de falso positivos no teste é o fato de que algumas bactérias sulfito redutoras persistem mais tempo do que *E. coli* no ambiente (SOBSEY; PFAENDER, 2002). *Clostridium* sp. é um exemplo deste grupo de bactérias que podem ser detectadas pelo teste H₂S e é um indicador de contaminação fecal remota. Existe, também, a possibilidade desse resultado ocorrer devido a presença de bactérias sulfito redutoras encontradas naturalmente no ambiente, de origem não fecal. Entretanto, esses micro-organismos são, em sua maioria, anaeróbios estritos, embora estudos sugerem que algumas bactérias sulfito redutoras possuem um certo grau de tolerância a oxigênio (SASS et al., 2002; KJELDSEN; JOULIAN; INGVORSEN, 2004). Outra condição necessária para o crescimento dessas bactérias é um meio com alta concentração de matéria orgânica (MOSLEY; SHARP, 2005). Nenhuma das amostras deste estudo apresentaram esta característica.

A ocorrência de resultados falso negativos pode ser explicado pelo risco de se introduzir uma contaminação bacteriana externa durante o processamento da amostra ser maior pela técnica membrana filtrante pois há uma maior manipulação durante o procedimento se comparado com o teste H₂S.

Mosley, Singh e Sharp (2004) analisaram amostras de água de rio e de poços após a passagem do ciclone Ami pelas ilhas do pacífico utilizando o H₂S e a membrana filtrante para detectar coliformes totais e fecais. Seus resultados mostraram que apenas 11% e 8% das amostras positivas para coliformes fecais e totais, respectivamente, não foram detectadas pelo método H₂S. Mostraram também que 2% e 6% das amostras que ficaram positivas com o teste H₂S não apresentaram coliformes totais e fecais, respectivamente. Vários estudos também comparam as técnicas membrana filtrante e Colilert® com amostras de água de diferentes origens. Du Preez e Genthe (1996) mostraram que o Colilert® apresentava uma taxa de falsos positivos para *E. coli* de 7,2% e uma taxa de 12,5% de falsos negativos. Sundram, Bailey e Green (2000) indicaram que o Colilert® proporcionava 1,03 vezes mais resultados positivos do que a membrana filtrante mostrando que o Colilert® tinha a tendência de apresentar mais resultados falsos negativos do que a membrana filtrante. Os resultados do presente estudo também indicaram falsos positivos e negativos tanto na técnica H₂S quanto no Colilert entretanto, a porcentagem é diferente devido a diferença no número de amostras estudadas.

Com relação a comparação das metodologias (tabela 7 e 8), observou-se que o teste H₂S apresentou especificidade maior ou igual quando foi utilizado 100 mL da amostra (67%). A especificidade do teste H₂S com o grupo coliformes totais também foi melhor (100%) do que com *E. coli* (60% - 100%). Essa diferença ocorre pois o grupo coliformes totais contêm os micro-organismos produtores de H₂S enquanto que a maioria de *E. coli* não são capazes de produzir H₂S. Quanto a sensibilidade do teste H₂S, não houve uma alteração entre os micro-organismos indicadores no volume 100 mL de amostra, todavia, com 20 mL de amostra houve uma pequena diminuição na sensibilidade se comparado com coliformes totais.

Khush e colaboradores (2013) também relataram uma especificidade maior do teste H₂S com coliformes totais mas, também, observaram uma sensibilidade maior. Wright e colaboradores (2012), em uma revisão com 51 trabalhos, observaram uma diminuição na sensibilidade do teste H₂S comparado com *E. coli* em amostras de águas subterrâneas. Observaram, também, que a sensibilidade era baixa e a especificidade alta em comparação com *E. coli* nos estudos realizados na Índia, onde o teste H₂S é muito utilizado (WRIGHT et al., 2012). Este fato também foi observado em nossos resultados (Tabela 7).

Com relação ao meio com desoxicolato de sódio (L000:D03 – considerado mais sensível nos testes em laboratório), observou-se uma ligeira queda na sensibilidade e no NPV, principalmente no volume 20 mL. Apesar do acréscimo de desoxicolato de sódio ao meio de cultura diminuir o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, pode ocorrer também queda

na detecção de *Clostridium perfringens* e, com isso, uma diminuição na sensibilidade e NPV (SOBSEY; PFAENDER, 2002).

Um trabalho realizado em Bangladesh, analisou 382 amostras de água comparando o teste H₂S com a membrana filtrante (*E. coli*). Seus resultados indicaram que a sensibilidade e o valor preditivo positivo (proporção realmente positiva) do teste H₂S em comparação com a baixa concentração *E. coli* (<100 UFC/100mL) foi menor do que 40% (GUPTA et al., 2008). Os resultados do presente estudo encontraram valores maiores do que estes reportados por Gupta e colaboradores (2008) (Tabela 7).

Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e negativo (NPV) e acurácia do teste H₂S com os três meios e os dois volumes analisados em comparação com a membrana filtrante de acordo com os dois micro-organismos indicadores .

	H ₂ S/Membrana Filtrante											
	<i>E. coli</i>						Coliformes Totais					
	L000:D00		L000:D03		L250:D00		L000:D00		L000:D03		L250:D00	
	20mL	100mL	20mL	100mL	20mL	100mL	20mL	100mL	20mL	100mL	20mL	100mL
Sensibilidade	67%	67%	0%	67%	67%	67%	50%	67%	0%	67%	33%	67%
Especificidade	80%	60%	100%	60%	100%	60%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
PPV	67%	50%	-	50%	100%	50%	100%	100%	-	100%	100%	100%
NPV	80%	75%	63%	75%	83%	75%	40%	50%	25%	50%	33%	50%
Acurácia	75%	63%	63%	63%	88%	63%	63%	75%	25%	75%	50%	75%

Com relação ao Colilert, foi observado que a sensibilidade, o PPV, o NPV e a acurácia foram mais baixas na detecção de *E. coli* do que de coliformes totais. Somente a especificidade foi maior (Tabela 8). Esses resultados são parecidos com os resultados do teste H₂S, entretanto a sensibilidade para *E. coli* foi menor no Colilert do que em todos os meios testados pelo H₂S e volumes.

Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e negativo (NPV) e acurácia do teste Colilert em comparação com a membrana filtrante

Colilert/Membrana Filtrante		
	<i>E.coli</i>	CT
Sensibilidade	33%	100%
Especificidade	80%	50%
PPV	50%	86%
NPV	67%	100%
Acurácia	63%	88%

6 CONCLUSÕES

- Nos testes de sensibilidade realizados em laboratório, o meio H₂S sem L-cistina e com 0,3% de desoxicolato de sódio (L000:D03) foi mais sensível na detecção de micro-organismos produtores de H₂S.
- Nos testes em campo:
 - o meio L000:D03 apresentou uma diminuição na sensibilidade e no valor preditivo negativo esperado pois a presença de desoxicolato de sódio diminui a detecção de *Clostridium perfringens* pelo teste H₂S.
 - A metodologia H₂S apresentou uma sensibilidade maior na detecção de *E. coli* quando comparada com o Colilert.
 - A sensibilidade do teste H₂S foi de 67%, menor do que a literatura descreve. Entretanto esta diferença é explicada pela pequena quantidade de água amostrada.
 - Houveram resultados falsos positivos e negativos em ambos os testes, no entanto, a proporção foi diferente ao encontrado na literatura devido a amostragem.
- O meio com adição de 0,3% de desoxicolato de sódio se mostrou eficiente em laboratório sendo recomendado seu uso apesar da diminuição da sensibilidade em campo devido a poucas amostras que foram analisadas.

REFERÊNCIAS²

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 13th ed. Washington, DC, 1971.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, DC, 1998.

ASHBOLT, N.; GRABOW, W.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. In: FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. (Ed.). **Water quality: Guidelines, standards and health**. 1. ed. London: WHO, 2001.

BAKER, R. W. Overview of Membrane Science and Technology. In: **Membrane Technology and Applications**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 545.

BISSONNETTE, G. K.; JEZESKI, J. J.; MCFETERS, G. A.; STUART, D. G. Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 590–595, 1977.

BRENNER, K. P.; RANKIN, C. C.; ROYBAL, Y. R.; STELMA, G. N.; SCARPINO, P. V; DUFOUR, A. P. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3534–44, 1993.

CAMPER, a. K.; MCFETERS, G. a. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 633–641, 1979.

CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. Manual of tropical Medicine. Williams Wood & Co., Nova Iorque, 3ed, p. 959-960, 1919.

CASTILLO, G.; THIERS, R.; DUTKA, B. J.; EL-SHAARAWI, a. H. Coliphage association with coliform indicators: A case study in Chile. **Toxicity Assessment**, v. 3, n. 5, p. 535–550, 1988.

CASTILLO, G.; DUARTE, R.; RUIZ, Z.; MARUCIC, M. T.; HONORATO, B.; MERCADO, R.; COLOMA, V.; LORCA, V.; MARTINS, M. T.; DUTKA, B. J. Evaluation of disinfected and untreated drinking water supplies in chile by the h2s paper strip test. **Water Research**, v. 28, n. 8, p. 1765–1770, 1994.

CETESB. Coliformes totais e fecais - determinação pela técnica de tubos múltiplos: método

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

de ensaio. (Norma Técnica L5.202). São Paulo, 1993.

CETESB. Coliformes termotolerantes: Determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A1: método de ensaio. (Norma Técnica L5.406). São Paulo, 2007.

CIEBIN, B. W.; BRODSKY, M. H.; EDDINGTON, R.; HORSNELL, G.; CHONEY, A.; PALMATEER, G.; LEY, A.; JOSHI, R.; SHEARS, G. Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3940–3942, 1995.

CLARK, M. A.; BARRETT, E. L. The *phs* gene and hydrogen sulfide production by *salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2391–2397, 1987.

DIFCO. **The difco manual**. 11. ed. Maryland: Division of Becton Dickinson and Company, 1998.

DU PREEZ, M.; GENTHE, B. **Evaluation of Rapid Methods for The Detection of Indicator Organisms in Drinking Water**. p. 8, 1996

DZIUBAN E. J.; LIANG, J. L.; CRAUN, G. F.; HILL, V.; YU, P. A.; PAINTER, J.; MOORE, M.; CALDERON, R. L.; ROY, S. L.; BEACH, M. L. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water - United States, 2003-2004. **MMWR** v. 55(SS12), p. 1-24, 2006.

EDBERG, S. C.; EDBERG, M. M. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 61, n. 5, p. 389–99, 1988.

EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 106S–116S, 2000.

EUROPEAN UNION (EU). Proposed for a Council Directive concerning the quality of water intended for human consumption. Com (94) 612 Final. **Official Journal of the European Union**, v. 131, p. 5-24, 1995.

EVANS, T.; WAARVICK, C.; SEIDLER, R.; LECHEVALLIER, M. Failure of the most-probable-number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 1, p. 130–138, 1981.

FIORILLO, C. A. P. Recursos Hídricos. In: FIORILLO, C. A. P. (ed.) **Curso de Direito Ambiental Brasileiro**. 10 ed. São Paulo: Saraiva, p. 642, 2009.

FRICKE, C. R. ; WARDEN, P. S. ; DESARNO, M.; ELDRED, B. J. **Significance of methods and sample volumes for e. coli and total coliform measurements**. Denver: Water Research Foundation, 2010.

FUNASA. **Manual de saneamento**. 3. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2007.

GAUDET, I. D.; FLORENCE, L. Z.; COLEMAN, R. N. Evaluation of test media for routine monitoring of *Escherichia coli* in nonpotable waters. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 62, n. 11, p. 4032–4035, 1996.

GELDREICH, E. E. Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: BERG, G. (Ed.). **Indicators of Viruses in Water and Food**. [s.l.] Ann Arbor Science Publishers, 1978. p. 424.

GENTHE, B.; FRANCK, M. A Tool for Assessing Microbial Water Quality in Small Community Water Supplies: an H₂S Strip Test. **Water Research Commission**, Gezina – South Africa: Report N° 961/1/99, p. 27, 1999.

GERBA, C. P. Indicator Microorganisms. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. (Ed.). **Environmental Microbiology**. Second ed. Tucson: Elsevier, 2009. p. 485–499.

GRABOW, W. Waterborne diseases Update on water quality assessment and control. **Water SA**, v. 22, n. 2, p. 193–202, 1996.

GUPTA, S. K.; SHEIKH, M. a; ISLAM, M. S.; RAHMAN, K. S.; JAHAN, N.; RAHMAN, M. M.; HOEKSTRA, R. M.; JOHNSTON, R.; RAM, P. K.; LUBY, S. Usefulness of the hydrogen sulfide test for assessment of water quality in Bangladesh. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 2, p. 388–95, 2008.

HILDEBRANDT, T. M.; GRIESHABER, M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3352–3361, 2008.

HOTHORN, T.; HORNIK, K.; VAN DE WIEL, M. A.; ZEILEIS, A. (2006). A Lego System for Conditional Inference. **The American Statistician**, v.60, n.3, p. 257-263. 2006.

HU, C.; GIBBS, R.; HO, G. Detection of salmonella in composted wastewater sludge. **Environmental Science Report**. p. 38, 1995.

HUTCHINSON, M.; RIDGWAY, J. W. Microbiological Aspects of Drinking Water Supplies. In: SKINNER, F. A.; SCHEWAN J. M. (Eds.). **Aquatic Microbiology**. Academic Press, London, 1977.

IDEXX. Validation of Colilert®-18/Quanti-Tray® for the Enumeration of *E. coli* and Coliform Bacteria from Water, 2008. Disponível em: <http://www.idexx.fr/pdf/fr_fr/water/7537-01-colilert-18-report-eng2.pdf>. Acessado em 9 de novembro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008.

JOHNSON, S. **Health and water quality monitoring of pure home water's ceramic filter dissemination in the northern region of ghana**. Thesis. Massachusetts Institute of Technology, 2007.

JUNG, G. Hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 6, p. 601–610, 2002.

KASPAR, P.; GUILLEN, I.; RIVELLI, D.; MEZA, T.; VELAZQUEZ, G.; DE KASPAR, H. M.; POZZOLI, L.; NUNEZ, C.; ZOULEK, G. Evaluation of a simple screening test for the quality of drinking water systems. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 124–127, 1992.

KHUSH, R. S.; ARNOLD, B. F.; SRIKANTH, P.; SUDHARSANAM, S.; RAMASWAMY, P.; DURAIRAJ, N.; LONDON, A. G.; RAMAPRABHA, P.; RAJKUMAR, P.; BALAKRISHNAN, K.; COLFORD, J. M. H₂S as an Indicator of Water Supply Vulnerability and Health Risk in Low-Resource Settings: A Prospective Cohort Study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 251–259, 2013.

KJELDSSEN, K. U.; JOULIAN, C.; INGVORSEN, K. Oxygen tolerance of sulphate-reducing bacteria in activated sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 2038–2043, 2004.

LECHEVALLIER, M. W.; BUCKLEY, M. Clean Water: What is Acceptable Microbial Risk? **American Academy of Microbiology**, p. 18, 2007.

LUYT, C. D.; MULLER, W. J.; TANDLICH, R. Factors influencing the results of microbial surface water testing in South Africa. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301(Suppl), p. 28–29, 2011.

MACCONKEY, A. Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. **The Journal of Hygiene**, v. 5, p. 333–379, 1905.

MANJA, K.; MAURYA, M.; RAO, K. A simple field test for the detection of faecal pollution in drinking water. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, n. 5, p. 797–801, 1982.

MANJA, K.S.; SAMBASIVA, R.; CHANDRASHEKHARA, K.V.; NATH, K.J.; DUTTA, S.; GOPAL, K.; IYENGAR L.; DHINDSA S.S.; PARIJA S.C. Report of Study on H₂S Test for Drinking Water, 96 Pages, UNICEF, New Delhi. 2001.

MARTINS, M. T.; CASTILLO, G.; DUTKA, B. J. Evaluation of drinking water treatment plant efficiency in microorganism removal by the coliphage, total coliform and H₂S paper strip tests. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 11–12, p. 403–407, 1997.

MCCRADY, M. H. The Numerical Interpretation of Fermentation Tube Results. **Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 183–212, 1915.

MCFETERS, G. a.; CAMERON, S. C.; LECHEVALLIER, M. W. Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 97–103, 1982.

MEDEMA, G. J.; PAYMENT, P.; DUFOUR, A.; ROBERTSON, W.; WAITE, M.; HUNTER, P.; KIRBY, R.; ANDERSSON, Y. Safe drinking water: an ongoing challenge. In:

WHO (ed.) **Assessing microbial safety of drinking water: improving approaches and methods**. London: IWA Publishing, p. 295, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001, Anuário estatístico de saúde do Brasil, Ministério da Saúde –Brasil, <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cmf>>. Acesso: Janeiro de 2009.

MOSLEY, L. M.; SHARP, D. S.; SINGH, S. Effects of a tropical cyclone on the drinking-water quality of a remote Pacific island. **Disasters**, v. 28, n. 4, p. 405–17, dez. 2004.

MOSLEY, L. M.; SHARP, D. S. The Hydrogen Sulphide (H₂S) Paper-Strip Test. **SOPAC Technical Report**. v. 373, 2005.

NAIR, J.; GIBBS, R.; MATHEW, K.; HO, G. E. Suitability of the H₂S Method for Testing Untreated and Chlorinated Water Supplies. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 119-126, 2001a.

NAIR, J.; GIBBS, R.; MATHEW, K.; HO, G. SUITABILITY OF THE H₂S METHOD FOR TESTING UNTREATED AND CHLORINATED WATER SUPPLIES. **Water science and technology**, v. 44, n. 6, p. 119–126, 2001b.

NORTH IRELAND ENVIRONMENTAL AGENCY. European and National Drinking Water Quality Standards. Belfast: NIEA, 2014.

PANT, H.; SARFARAZ, S.; IYENGAR, L. Evaluation of L -Cystine-amended H₂S test for the detection of faecal pollution in potable water: comparison with standard multiple tube fermentation method. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 317–320, 2002.

PATHAK, S.; GOPAL, K. Efficiency of modified H₂S test for detection of faecal contamination in water. **Environmental monitoring and assessment**, v. 108, p. 59–65, 2005.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Cultural methods**. Elsevier Inc., 2 ed. v. 80, 2009.

PHELPS, E. B. A Method for Calculating the Numbers of B. coli from the results of dilution tests. **American Public Health Association**, v. 4, p. 141–145, 1908.

PILLAI, J.; MATHEW, K.; GIBBS, R.; HO, G. E. H₂S paper strip method- A bacteriological test for faecal coliforms in drinking water at various temperatures. **Water Science**, v. 40, n. 2, p. 85–90, 1999.

PORTAL DA SAÚDE. **Situação epidemiológica das doenças diarreicas agudas**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549>. Acessado em 10 de junho de 2012.

QIU, R.; ZHAO, B.; LIU, J.; HUANG, X.; LI, Q.; BREWER, E.; WANG, S.; SHI, N. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2-3, p. 1310–1315, 2009.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2016.

RATTO, A.; DUTKA, B.; VEGA, C.; LOPEZ, C.; EL-SHAARAWI, A. Potable water safety assessed by coliphage and bacterial tests. **Water research**, v. 23, n. 2, p. 253–255, 1989.

RATTO, A.; EL-SHAARAWI, A. Coliphage association with coliform indicators: a case study in Peru. **Toxicity Assessment: An International Journal**, v. 3, p. 519–533, 1988.

RIVERA, I. N. G.; MARTINS, M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 17, p. 115-136, 1996.

ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; DE-ROUDIN, M.-R.; LARENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, p. 31–54, 2002.

ROSER, D.; ASHBOLT, N.; HO, G.; MATHEW, K.; NAIR, J.; RYKEN-RAPP, D.; TOZE, S. Hydrogen sulphide production tests and the detection of groundwater faecal contamination by septic seepage. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 291–300, 2005.

SARTORY, D. Improved recovery of chlorine-stressed coliforms with pyruvate supplemented media. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 5-6, p. 255–258, 1995.

SASS, A. M.; ESCHEMANN, A.; KÜHL, M.; THAR, R.; SASS, H.; CYPIONKA, H. Growth and chemosensory behavior of sulfate-reducing bacteria in oxygen-sulfide gradients. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 40, n. 1, p. 47–54, 2002.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? **Miscellany**. v. 45, p. 1025-1029, 2007.

SOBSEY, M. D.; PFAENDER, F. K. Evaluation of the H₂S Method for Detection of Fecal Contamination of Drinking Water. Geneva: WHO. p. 44, 2002.

STOFFELS, L.; KREHENBRINK, M.; BERKS, B. C.; UNDEN, G. Thiosulfate reduction in salmonella enterica is driven by the proton motive force. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 475–485, 2012.

SUNDRAM, A.; BAILEY, I. W.; GREEN, E. The Application of New Technology Used for Identifying Bacteria from Water Samples. In: **Proceedings of the WISA 2000 Biennial Conference**. Sun City, South Africa, 28 May–1 June 2000. Disponível em <<http://www.ewisa.co.za/literature/files/134sundram.pdf>>. Acessado em 10 de novembro de 2014.

TAMBEKAR, D. H.; GULHANE, S. R.; BANGINWAR, Y. S. Evaluation of Modified Rapid H₂S Test for Detection of Fecal Contamination in Drinking Water from Various Sources. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 40–45, 1 jan. 2008.

TAMBEKAR, D. H.; HIRULKAR, N. B.; GULHANE, S. R.; RAJANKAR, P. N.; DESHMUKH, S. S. Evaluation of hydrogen sulphide test for detection of fecal coliform contamination in drinking water from various sources. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 713–717, 2007.

TAMBEKAR, D.; HIRULKAR, N. Rapid and modified field test for detection of faecal contamination in drinking water. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 66, n. August, p. 667–669, 2007.

TARR, H. L. A. The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. **Biochemical Journal**, v. 27, p. 1869–1874, 1934.

USEPA. Bacteriological Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters. EPA-440/5-84-002. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards. 1986.

USEPA. Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC). **EPA-821-R-09-007**, 2009.

USEPA. National Primary Water Regulations. Disponível em <<http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#Microorganisms>>. 2014. Acessado em 15 de novembro de 2014.

VENKOBACHAR, C.; KUMAR, D.; TALREJA, K.; KUMAR, A.; IYENGAR, L. Assessment of bacteriological water quality using a modified H₂S strip test. **Aqua (Oxford)**, v. 43, n. 6, p. 311–314, 1994.

WADE, T. J.; PAI, N.; EISENBERG, J. N. S.; COLFORD, J. M. Do U.S. Environmental Protection Agency Water Quality Guidelines for Recreational Waters Prevent Gastrointestinal Illness? A Systematic Review and Meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1102–1109. 2003.

WAITE, W. M. A critical appraisal of the coliform test. **Journal of the Institution of Water Engineers and Scientists**, v.39, p. 341-357, 1985.

WHO. Bathing water quality and human health: faecal pollution. Geneva: World Health Organization, p. 58, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. Fourth ed. Geneva: WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Progress on Drinking Water and Sanitation - 2013 update. p. 67, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Progress on Drinking Water and Sanitation - 2014 update. p. 67, 2014.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (WWAP). **The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk**. Paris, UNESCO, p. 866, 2012.

WRIGHT, J.; YANG, H.; WALKER, K.; PEDLEY, S.; ELLIOTT, J.; GUNDRY, S. W. The H₂S test versus standard indicator bacteria tests for faecal contamination of water: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v.17, n.1, p.94–105, 2012.