

Produto: P&D AQUA coli – ONPG/MUG

1. Indicação

Deteção quantitativa e qualitativa de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água por de substratos enzimáticos específicos que possibilitam a recuperação e a identificação desses microrganismos presentes na água.

Tipo de amostras de água: bruta, tratada, salobra, salgada e efluente, superficial, subterrânea e água de reuso

2. Princípio

Este método se baseia na utilização de um substrato específico, que permitem a pesquisa simultânea de coliformes totais e de *Escherichia coli* em menor tempo. Os testes são baseados na atividade da β -galactosidase sobre o substrato ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) e da β -D-glicuronidase sobre o substrato MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo).

O teste baseia-se na adição dos substratos em 100 ml de amostra de água, seguido de incubação de 35°C a 37°C por 24 horas. A atividade dos coliformes totais sobre o substrato ONPG produz uma coloração amarela, indicando a sua presença. A presença da *Escherichia coli* pode ser confirmada por fluorescência sob a luz ultravioleta (UV) (365 nm), devido sua atuação sobre o substrato MUG. A sensibilidade da metodologia para *Escherichia coli* é de 1 UFC/100ml de amostra. A especificidade para não-coliformes é 10^6 UFC/100mL. Pode ser utilizado em cartelas estéreis de 51 ou 97 cavidades para contagens de até 200NMP/100ml ou 2.419NMP/100ml, respectivamente, conforme 9223 ENZYME SUBSTRATE COLIFORM TEST - 4th edition of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

3. Composição

Componentes	g/L
Nutrientes e sais minerais	19,4
Substratos cromogênicos	0,6

4. Informações importantes

- Produto para uso laboratorial.
- Utilizar de acordo com as instruções.

- Todas as amostras devem ser manipuladas como potencialmente infecciosas e destruídas de acordo com as normas de biossegurança.
- Não reutilizar.
- Não utilizar após o prazo de validade.
- Armazenar em temperatura ambiente (15° a 30°C).
- Não congelar.

5. Equipamentos e materiais necessários

- Estufa de incubação 35°C a 37°C.
- Recipientes estéreis para coleta com 100 ml de capacidade.
- Frascos que não emitam fluorescência quando expostos à luz ultra-violeta de 365 nm, com capacidade para 100 mL.
- Comparador de cor.
- Câmara de Luz UV 365 nm.

6. Procedimento

6.1 Coleta de amostra

- **Tipo de amostra:** águas de poços, fontes, água mineral, reservatórios, sistemas de distribuição e determinação da eficiência operacional de uma estação de tratamento de águas e outras amostras de águas.
- As amostras devem ser coletadas em recipientes estéreis e testadas o mais rapidamente possível. Do contrário, manter em geladeira (2-8°C) por até 24h.
- Proceder à amostragem de 100 ml de amostra em recipiente estéril seguindo como descrito abaixo:

Água clorada: acrescentar 0,1 ml de solução de Tiosulfato de Sódio a 10%.

Água in natura: acrescentar 0,2 ml de solução de EDTA 15% objetivando quelar metais presentes na amostra que possam interferir no desenvolvimento analítico.

- Procedimentos assépticos devem ser adotados para a realização da coleta.
- Análise as amostras o mais rápido possível após sua chegada ao laboratório.

6.2 Procedimento técnico

6.2.1 Teste qualitativa

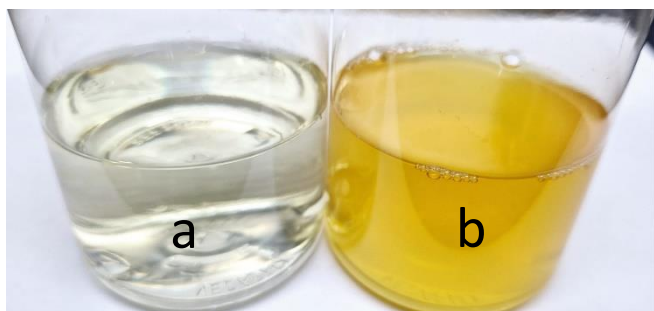
- Abrir o sachê contendo o substrato cromogênio e acrescentar todo o conteúdo no frasco contendo 100 ml de amostra da água.

- Agitar suavemente até que ocorra a diluição completa e a homogeneização do meio.
- Incubar o frasco teste em estufa a 35° a 37°C durante 24h.

6.2.1.1 Leitura e interpretação do teste

- Coliformes totais e *Escherichia coli* negativo:** A amostra permanece inalterada e sem turvação indica.
- Coliformes totais positivo:** A amostra desenvolve coloração amarela.
- Escherichia coli* positivo:** A amostra desenvolve cor amarela e é observada fluorescência azul esverdeada quando exposta a luz UV 365nm, em ambiente escuro.

Importante: Não utilizar frascos de vidro, pois os mesmos emitem fluorescência e interferem na interpretação do teste.



Coliformes totais: a) Negativo; b) Positivo



***Escherichia coli*:** c) Negativo; d) Positivo

6.2.2 Prova quantitativa

- Abrir o sachê contendo o substrato cromogênio e acrescentar todo o conteúdo no frasco contendo 100 ml de amostra da água.
- Agitar suavemente até que ocorra a diluição completa e a homogeneização do meio.

- Transferir alíquotas iguais de 20 ml para 5 tubos estéreis (que não emitam fluorescência).
- Incubar em estufa a 35° a 37°C durante 24h.

6.2.2.1 Leitura e interpretação do teste

- Coliformes totais e *Escherichia coli* negativo:** A amostra permanece inalterada e sem turvação indica.
- Coliformes totais positivo:** A amostra desenvolve coloração amarela.
- Escherichia coli* positivo:** A amostra desenvolve cor amarela e é observada fluorescência azul esverdeada quando exposta a luz UV 365nm, em ambiente escuro.
- Proceder à contagem com base no número de tubos positivos usando a tabela a seguir:

Tubos Positivo	NMP/100 ml
0	< 1,1
1	1,1
2	2,6
3	4,6
4	8
5	>8

6.3 Liberação dos Resultados

6.3.1 Não houve crescimento

- Prova qualitativa**
 - Ausência de coliformes totais/ 100ml
 - Ausência de *Escherichia coli*/ 100ml
- Prova quantitativa**
 - Coliformes totais: <1,1 NMP/ 100ml
 - *Escherichia coli*: <1,1 NMP/ 100ml

6.3.2 Havendo crescimento

- Prova qualitativa**
 - Presença de coliformes totais/100ml
 - Presença de *Escherichia coli* / 100ml
- Prova quantitativa**
 - Coliformes totais: (indicar contagem conforme tabela) NMP/ 100ml.
 - *Escherichia coli*: (indicar contagem conforme tabela) NMP/ 100ml.

6.4 Limitações do método

Resultados falso positivo ou negativo podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Elevado grau de contaminação, sem diluição prévia.
- Tempo longo entre a coleta da amostra e análise.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Transporte inadequado da amostra.
- Erro de leitura e interpretação.
- Utilização de materiais contaminados.
- Utilização de material vencido.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.
- Utilizar frascos que emitem fluorescência.

7. Controle de Qualidade

Microrganismo	Concentração	Resultado esperado
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	10-100 UFC	Crescimento e viragem de cor para amarelo. Na luz UV fluorescência azul esverdeada.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	10-100 UFC	Crescimento e viragem de cor para amarelo
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	>10 ⁶ UFC	Inibição completa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>10 ⁶ UFC	Inibição completa

*incubação 35° a 37°C por 24 horas

8. Referências

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n° 275 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnica de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

APHA. Standard Methods Committee of the American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 9223 enzyme substrate coliform test In: Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. Lipps WC, Baxter TE, Braun-Howland E, editors. Washington DC: APHA Press.

Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6ª edição. Brasília: Anvisa, 2022.

Fabricado por: P&D BIOTECH FABRICAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E CONTROLE DE QUALIDADE LTDA