VALDINEI LANKEWICZ

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COLIFORMES DA ÁGUA DO RIO LIGEIRO NO MUNICÍPIO DE PATO BRANCO - PR

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Verzani Nogueira.

Florianópolis
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO
VALDINEI LANKEWICZ

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COLIFORMES DA ÁGUA DO RIO LIGEIRO NO MUNICÍPIO DE PATO BRANCO - PR

Esta monografia foi julgada adequada para a obtenção do título de
Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas
Pato Branco, 26 de junho de 2013.

_____
Prof.ª Drª Maria Márcia Imenes Ishida
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. Alexandre Verzani Nogueira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

_____
Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Consultor Ad Hoc
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

_____
Prof. Dr. Márcio José Rossi
Consultor Ad Hoc
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo a Deus Todo Poderoso. Como já disse Paster (1957) "*Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène.*" Pasteur - "Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muita ciência o traz de volta."

Agradecer à minha família, e pedir desculpas por todos os momentos que parecia tão ausente (estressado, bravo, com sono e desaparecido da face da terra trancado em meu quarto, segundo minha filha Carolina) durante essa jornada.

Agradecer de maneira especial à minha esposa pelas noites que ela teve que dormir ouvindo o "tec-tec" do teclado ao lado da cama. Agradecer aos meus filhos Carolina e Tiago pelas vezes que me ajudaram durante as coletas das amostras.

Agradeço imensamente ao meu Orientador, o Prof. Dr. Alexandre Verzani Nogueira, que me direcionou e mostrou como realizar este trabalho;

Agradeço à UFSC, que através da FAPEU (nome das pessoas) forneceu meios para que esse projeto pudesse ser concluído;

Agradeço à UAB-Polo Pato Branco, que permitiu acesso ao seu laboratório de Biologia, para que a parte laboratorial deste trabalho fosse realizado;

Agradeço à Cácia R. R. Webber, Coordenadora Polo UAB Pato Branco, e a todos os cooperadores do polo, por toda ajuda;

Agradecer à Luciana e a Aline pelas vezes que me ajudaram no laboratório.

Quero também agradecer de forma especial aos técnicos de laboratório, Paola Polla e Fernando Massarotti, por todo o apoio oferecido, pelas horas depois do horário deles que ficaram no laboratório, pelas aulas de como se lavar um tubo de ensaio (e foram muitos), além de todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram nessa longa caminhada.

When the well runs dry, we shall know the value of water.
Quando o poço secar, saberemos o valor da água
Benjamin Franklin

RESUMO

Pato Branco nasceu e cresceu no entorno do Rio Ligeiro.

O presente trabalho teve como objetivo identificar e apresentar os impactos microbiológicos através do uso dos indicadores de contaminação de coliformes totais e termo tolerantes que a cidade de Pato Branco causa ao Rio Ligeiro durante o percurso do mesmo através da porção urbana da cidade.

Para tanto utilizamos o método dos tubos múltiplo (MTM) para analisar a água, e a tabela de Número Mais Provável (NMP) para quantificar a presença de coliformes nesta água.

Pudemos verificar o alto nível de contaminação por coliformes termotolerantes em toda a extensão do rio, o que o classifica com águas de classe IV. O que torna evidente a necessidade de que sejam tomadas providencias urgentes, tanto pelo poder público, como pela sociedade para que haja uma melhora na qualidade da água do Rio Ligeiro.

Palavras Chave: Pato Branco, Rio Ligeiro, *Escherichia coli*, Coliformes, Meio Ambiente

ABSTRACT

Pato Branco was born and raised in the vicinity of Rio Ligeiro.

This study aimed to identify and present the impacts of microbiological contamination using coliforms as indicators of this contamination caused by the city of Pato Branco at the Rio Ligeiro during the path through in the urban portion of the town.

To this end, the method used to analyze as the multiple tubes (MMT) and Most Probable Number (MPN) table for quantifying the presence of coliforms in this water.

We saw the high level of contamination by fecal coliform throughout the length of the river, which ranks with class IV waters. What makes evident the need for urgent action to be taken, both by the public as by society so that there is an improvement in the water quality of the River Light.

Keywords: Pato Branco, Rio Ligeiro, *Escherichia coli*, coliforms, Environment

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização do município de Pato Branco no estado do Paraná e no Brasil..... 14
Figura 2 - Vista geral das áreas de coleta e da cidade de Pato Branco – Vista Aérea 19
Figura 3 - Bacias Hidrográficas de Pato Branco (parcial) 20
Figura 4 – Ponto de coleta 01 – Vista Aérea 21
Figura 5 - Ponto de coleta 01 – Foto nascente do rio Ligeiro..... 22
Figura 6 - Local da Nascente oficial do Rio Ligeiro - Lago Maior 23
Figura 7 - Local da Nascente oficial do Rio Ligeiro - Lago Menor 24
Figura 8 - Ponto de Coleta 02 – Vista Aérea 25
Figura 9 - Ponto de Coleta 02 - Foto 25
Figura 10 - Ponto de Coleta 03 – Vista Aérea. 27
Figura 11 - Ponto de Coleta 03 - Foto. 28
Figura 12 - Ponto de Coleta 04 – Vista Aérea 29
Figura 13 - Ponto de Coleta 04 - Foto 30
Figura 14 - Coleta manual (águas superficiais) 31
Figura 15 - Esquema de distribuição das amostras. 34
Figura 16 - Tubo Positivado - Produção de gás(tubo da direita).36
Figura 17 - Tubo positivado – Opacidade 37
Figura 18 - Procedimento para inoculação no caldo VBB 39
Figura 19 - Caldo VB – Positivado (produção de gás) 39
Figura 20 - Procedimento Inoculação..... 41
Figura 21 – Caldo EC – Esquerda negativado – direita positivado (produção de gás) 42

Lista de Tabelas

Tabela 1 -- Etiqueta de Identificação do frasco de coleta,..... 32
Tabela 2 - Composição caldo Lauril Triptose em g/l 33
Tabela 3 - Identificação dos tubos de ensaio com as amostras... 35
Tabela 4 - Composição caldo VBB em g/l 37
Tabela 5 - Composição caldo EC em g/l 40
Tabela 6 - Dados relativos à primeira coleta - NMP/100ml de amostra..... 43
Tabela 7 - Dados relativos à segunda coleta..... 43
Tabela 8 - Dados relativos à terceira coleta..... 43
Tabela 9 - Dados relativos à quarta coleta..... 44
Tabela 10 – dados relativos à quinta coleta 44
Tabela 11 - dados relativos à sexta coleta 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	- American Public Health Association
AWWA	- American Water Works Association
CETESB	- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CLT	- Caldo Lauril Triptose
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
EC	- *Escherichia coli*
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	- Food and Drug Administration
FNS	- Fundação Nacional de Saúde
GPS	- Global Positioning System
IAP	- Instituto Ambiental do Paraná
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
MPN	- most probable number
NMP	- Número Mais Provavel
PNMA	- Política Nacional do Meio Ambiente
UFF	- Universidade Federal Fluminense
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina
UNESCO	- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
USDA	- United State Departament of Agriculture
UTFPR	- Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *campus* de Pato Branco
VBB	- Verde Bile Brilante
VBBL	- Verde Bile Brilante Lactose
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....
1.1. RELEVO E HIDROGRAFIA .....
2. OBJETIVOS .....
2.1. OBJETIVO GERAL .....
3. COLETAS .....
3.1 PONTOS DE AMOSTRAGEM.....
3.1.1 VISTA GERAL DA ÁREA DE COLETA.....
3.1.2 PONTO 01 - NASCENTE.....
3.1.3 PONTO 02 - INÍCIO DO ENCLAUSURAMENTO (GALERIA) DO RIO .....
3.1.4 PONTO 03 - FINAL DO ENCLAUSURAMENTO DO RIO .....
3.1.5 PONTO 04 - SAÍDA DO RIO DO PERÍMETRO URBANO.....
3.3 COLETA.....
3.4 TRANSPORTE DAS AMOSTRAS.....
4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....
4.1 TESTE PRESUNTIVO PARA COLIFORMES:.....
4.1.1 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....
4.1.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....
4.1.3 QUANTIDADE DE TUBOS DE ENSAIOS TESTADOS .....
4.1.4 INCUBAÇÃO.....
4.2 TESTE CONFIRMATIVO PARA COLIFORMES.....
4.2.1 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....
4.2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....
4.3 TESTE PARA COLIFORMES TERMO TOLERANTES .....
4.3.1 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....
4.3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....
RESULTADOS.....
CONCLUSÕES .....
REFERÊNCIAS.....
ANEXO A - TABELA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) – SÉRIES DE TRÊS TUBOS .....
ANEXO B – PORTARIA 518/2004 MINISTÉRIO DA SAÚDE.....
ANEXO C - RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357/2005.....
ANEXO D - BACIAS HIDROGRÁFICAS DE PATO BRANCO .....
ANEXO E - MAPEAMENTO MATAS CILIARES DO MUNICÍPIO DE PATO BRANCO .....

1. INTRODUÇÃO

A importância que a água tem como componente essência à vida é irrefutável e, graças à ela, temos condições de viver neste planeta Rebouças (2002). A Terra é o único corpo do universo, até agora conhecido, onde a água ocorre em três estados físicos fundamentais, líquido, sólido (gelo) e gasoso (vapor), e, ainda citando Rebouças (2002), desde a antiguidade o homem tem criado formas de utilizar a água, seja criando poços para a captação, ou estruturas para seu transporte para uso humano e irrigação.

O acesso às fontes de água pura, sempre foi imprescindível para o desenvolvimento da sociedade humana, isso tanto é verdade que as primeiras cidades que se tem conhecimento, surgiram às margens de rios.

Segundo Gorski (2010), na história das civilizações, de modo geral, os cursos d´água, rios, córregos, riachos integravam sítios atraentes para assentamentos de curta ou longa permanência.

Quando o homem passou a se tornar sedentários, com a "descoberta" da agricultura, a importância dos rios se tornou mais evidente.

A proximidade dos rios permitiu o desenvolvimento e o aprimoramento da agricultura que, por sua vez, possibilitou um aumento considerável da produção de alimentos. Faber (2011). Esse mesmo autor ainda fala que o aumento da oferta de comida, permitiu um crescimento vertiginoso da população. Devido a isso, o excedente de alimentos passou a ser comercializado com outros povos. Surgindo assim, a figura das primeiras cidades.

> "The first cities in human history were located in agrarian Mesopotania, probably about 4000B.C. Cities were founded in the Nile Valley about 3000 B.C., in the Indus valley (present-day Pakistan) by 2500 B.C, in Yellow River Valley of China by 2000 B.C.", Brunn et al (2008).

Nota-se que os primeiros agrupamentos humanos em formas de cidades deram-se no entorno de grandes rios, que além de prover terra fértil para a agricultura, facilitava o escoamento da produção.

Os rios sempre foram uma fonte de água, alimentos, transporte, mas apesar de toda essa dependência, sempre foi comum esses corpos hídricos serem tratados com desleixo, recebendo o despejo de esgoto, lixo, assoreamento devido a lixiviação do solo, que chega até os rios

pela falta da proteção de mata ciliar. Desde a antiguidade o homem mostra preocupação com a preservação da qualidade da água.

Platão (427-347 a.C.) já via a necessidade de se disciplinar o uso da água, dada à sua grande importância socioeconômica

> "Qualquer um que tenha 'corrompido' a água de outrem, seja água de fonte, água de chuva estocada, jogando certas drogas [...] o proprietário deverá se queixar [...] e fará ele próprio, a estimativa do prejuízo: e aquele que será convencido de ter corrompido a água, além de reparar o prejuízo, será obrigado a limpar a fonte ou o reservatório, conforme as regras prescritas pelos intérpretes, seguindo a exigência dos casos e das pessoas" Platão apud Nicolazo (1989).

Ainda na antiguidade, Hipócrates já se relacionava o ambiente (clima, topografia, qualidade da água) com algumas doenças que poderiam acometer o ser humano, como explicitado em Rosen (1983). Já nesta época, Hipócrates tinha classificado e comparado as águas para consumo humano e recomendava a filtração, ou fervura, para assegurar uma boa saúde Silva (2000)

> "O tratado de Hipócrates - Ares, Águas e Lugares - procurou informar ao médico sobre a relação entre o ambiente e a saúde (incluindo fatores como: clima, topografia, qualidade da água, e mesmo organização política), mas omitiu um dos elementos mais significativos: as ocupações dos homens". Silva (2000)

Esse descaso com a água de maneira global, tem se mostrado bastante perigoso, pois, em alguns locais as fontes de água potável rapidamente se exaurem. A comunidade técnica brasileira já reconhece a chamada "crise da água" e a necessidade de melhorar as ações de vigilância e controle de sua qualidade. Revista Bio (1997). A integridade dos ecossistemas aquáticos vem sofrendo os impactos causados pelas atividades humanas e suas comunidades estão sujeitas às diversas alterações ambientais. A população microbiana aquática reflete as condições terrestres circundantes e as atividades ali exercidas, e os órgãos administrativos utilizam essa população, como indicadores para classificar os corpos d'água CONAMA (2005).

Águas que recebem o aporte de esgoto doméstico, seja pelo despejo direto, ou quando chove e a água da enxurrada carrega esse material que está disponível no solo até o rio, pelo fato de as margens não apresentarem a proteção ciliar, que funcionaria como um tipo de

barreira, apresentam uma grande quantidade de matéria orgânica, nesses locais pode-se encontrar bactérias do grupo dos coliformes (bactérias gram-negativas, aeróbias e aeróbias facultativas, não formadoras de esporos, que fermentam lactose, produzindo gás, no decorrer de um período de 48 horas) como a *Escherichia coli*, entre outros. A presença de *E. coli*, pode representar um risco potencial a saúde, o fato de que esses organismos são notadamente enterobactérias, provenientes do trato intestinal de animais de sangue quente, o que indica a contaminação por matéria fecal Madigan (2004) APHA (1998), Filho e Silva (2008).

Souza et al (1983), expõe que apresenta a presença de coliformes que são microrganismos de fácil detecção, podem denunciar a presença de outros agentes biológicos contaminantes, que podem se apresentar mais perigosos ao homem, e necessitarem de métodos de detecção mais elaborados e caros, o que torna os coliformes um importante indicador de contaminação microbiológica.

Conforme dados da UNICEF (2009):

> A maioria dos patógenos que causam diarreia compartilham modos semelhantes de transmissão - a partir das fezes de uma pessoa para a boca do outro. Isto é conhecido como a transmissão fecal-oral. Pode haver diferenças, no entanto, no número de organismos necessários para causar a doença clínica, ou no percurso do patógeno leva ao viajar entre indivíduos (por exemplo, a partir das fezes para alimentos ou para a água, que são então ingeridos)

Ainda segundo a UNICEF (2009), melhorias no acesso à água potável e saneamento adequado, juntamente com a promoção de boas práticas de higiene (particularmente, a lavagem das mãos com sabão), pode ajudar a prevenir a diarreia infantil. De fato, cerca de 88% das mortes que tem a diarreia como principal causa são atribuíveis à água insalubre, saneamento inadequado e falta de higiene.

A preocupação quanto à presença destes contaminantes deve-se ao fato que a água contaminada pode provocar infecções mesmo quando um pequeno grupo de microrganismos encontra-se presente nela. Madigan (2004).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), revelam que no mundo, cerca de 1,5 milhões de crianças morrem a cada ano devido a doenças diarreicas, a maioria delas são crianças com menos de 5 anos de idade (URBAN WORLD, Volume IV · Issue 04, p10).

1.1. RELEVO E HIDROGRAFIA

Figura 1 - Localização do município de Pato Branco no estado do Paraná e no Brasil.
Fonte: Wikipédia.

Segundo dados do site da prefeitura municipal de Pato Branco 2009, Pato Branco (detalhe FIGURA 1) localiza-se no 3° Planalto do Paraná, pertencente ao plano de declive do planalto basáltico de Santa Catarina e situando-se à nível nacional nos planaltos e chapadas da Bacia do Paraná, com formação de rochas cristalinas. O perímetro urbano situa-se ao longo da bacia do Rio Ligeiro, tendo as elevações tanto para Oeste, como para Leste, relativamente acentuadas.

Os lugares mais altos, no perímetro urbano: TV Sudoeste, Parque do Som, Premem e Morro da Cruz. No município uma das maiores elevações é de 898m próximo ao município de Vitorino, na zona sul.

Os mananciais em razão da topografia específica do Paraná, também dirigem-se para oeste, pertencendo a bacia do Iguaçu e este a sub-bacia do Paraná.

O município é banhado pela sub-bacia do Rio Pato Branco, que tem as nascentes no Gramado São Joaquim em Mariópolis, neste rio é feito a captação de água para a SANEPAR.

O que restou das matas nativas, aparece nas regiões ciliares preservadas. Deixando a desejar, pois a quantidade é inferior ao exigido pelo Código Florestal. Segundo dados do IPPUPB (2006), conforme legislação vigente em 2006, o total de mata ciliar que deveria existir

seria de 54,38km², mas nosso os rios da cidade apresentam apenas 27,59km², ou seja 50,70%. Isso tomando em conta todas as bacias da cidade, conhecendo o rio alvo do estudo, e sua localização, nota-se que não existe no Rio Ligeiro, em sua porção urbana, nem uma fração do que seria o necessário segundo a legislação.

A destruição da natureza, para fins agrícolas, causa entre outros problemas, o assoreamento de rios, lagoas, fontes e desmoronamento das margens dos rios.

Os principais rios são: Pato Branco, Ligeiro, Vitorino, todos afluentes do Rio Chopim.

Com exceção de Bom Sucesso do Sul e partes do Município de Itapejara D'Oeste, que são fronteiras secas, as demais são através de rios:

Rio Chopim: Coronel Vivida, Honório Serpa e Clevelândia.

Rio Vitorino: Vitorino e Renascença.

Rio Pato Branco: Mariópolis E, sub-afluentes.

Rio Ligeiro: com os mananciais, Riacho Fundo, da Vila Isabel (sem nome), Riacho dos Reis, o valetão (sem nome) Riacho das Pedras, Rio Passo das Pedras e Ribeirão dos Penso.

Microbacia do Arroio Gramado: afluentes e açudes.

Microbacia do Núcleo Dourado: Rio Dourado e Rio Santa Rita, com mais vinte sangas e nascentes d'água.

Microbacia do Rio Cachoeirinha: formada pelo Rio Arroio Solfa e seus afluentes.

Microbacia do Rio Tamanduá: formada pelo Rio, seus afluentes e muitos açudes (afluente do Rio Pato Branco).

Microbacia do Rio Independência: formada pelo Rio e seus afluentes, poucos açudes. Essa bacia é irrigada pelo Rio, com seus afluentes e pelo Rio Caçador (10% da área).

Microbacia do Rio Pato Branco: o rio com seus afluentes: arroio Pocinho, Rio Pinheiro com o Rio Passo Feio, Rio Conrado, Arroio Passo da Cruz e açudes naturais e artificiais. Possui em média 20 m de largura. Pouca mata ciliar, apenas 40% do necessário em toda a sua bacia.

Rio Quebra Freio: afluente do Rio Chopim.

A bacia do rio Ligeiro, com área total de 175,87 km^2 (17.587 ha) é contribuinte da margem esquerda do rio Chopim, que por sua vez é afluente da margem esquerda do rio Iguaçu (Jabour, 2010).

Foi alvo deste estudo a porção urbana do Rio Ligeiro, por ser um rio que tem suas nascentes em área urbana, sofre grande influência

da cidade na qualidade de sua água, conforme expressado no relatório da SANEPAR -Companhia Paranaense de Saneamento- (2010)

> A bacia do rio apresenta predomínio de ocupação rural, porém com a incidência de área urbana em suas cabeceiras. As principais fontes potenciais de poluição são os agrotóxicos, esgoto doméstico e industrial e cargas perigosas nas rodovias que cortam os mananciais SANEPAR (2010).

Foi escolhido o teste de coliformes/EC, através do método de tubos múltiplos (NMP) técnica essa concebida por McCrady(1915) para estimar densidade da população microbiana sem que fosse contanto necessário a contagem direta da mesma.

Esta técnica baseia-se teoria das probabilidades e consiste na constatação da presença ou ausência de crescimento do microrganismo em porções individuais oriundas da diluição seriada de uma amostra de amostra.

Optamos pelo uso desta técnica, por ela apresentar resultados satisfatórios e um custo baixo, a despeito de ser bastante trabalhosa.

> Os coliformes têm sido úteis para medir a ocorrência e grau de poluição fecal em águas há, aproximadamente, 70 anos. Durante este tempo, acumulou-se grande número de dados que permitem avaliação da sensibilidade e especificidade de tal indicador bacteriano da presença de poluição de origem fecal. Souza et al (1983).

É importante salientar que a utilização de apenas a contagem de coliformes não deve ser utilizado como padrão de avaliação de qualidade da água, pelo fato de que, conforme explicitado pelo Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano BRASIL(2006), o grupo dos coliformes inclui bactérias não exclusivamente de origem fecal, podendo ocorrer naturalmente no solo, na água e em plantas Brasil.

Segundo essa mesma fonte, coliformes podem se multiplicar em ambientes aquáticos, principalmente em países com climas tropicais. Por esse motivo, além dos testes presuntivos e confirmativos para coliformes, será efetuado o teste para a determinação *Escherichia coli*.

> *Escherichia coli* tem sido tradicionalmente usada para monitorar a qualidade da água potável, e continua a ser um parâmetro importante no

> monitoramento realizado como parte de verificação ou de vigilância.
>
> Coliformes termotolerantes podem ser usado como uma alternativa para o teste de *E. coli*, em muitas circunstâncias. Água destinada ao consumo humano não deve conter organismos indicadores de contaminação fecal. Na maioria dos casos, o controle de *E. coli* ou coliformes termotolerantes fornece um alto grau de segurança por causa dos seus grandes números em águas poluídas AHO (2011).

Coliformes fecais, entre as quais o principal representante é a *Escherichia coli*, fazem parte da microbiota de animais de sangue quente, entre os quais, o homem, a detecção de *E. coli* em amostra de água de uma fonte ambiental fornece evidências diretas de contaminação fecal. Nogueira (2010), Melo (2006), Pope (2003).

> Embora a maioria das linhagens de *E. coli* sejam bactérias comensais inofensivas, algumas linhagens podem causar doenças aos humanos, como a *E. coli* O157: H7, que está entre os sorotipos mais reconhecidos por causar grandes surtos por meio dos alimentos e pela água (ISHII; SADOWSKY, 2008). O sorotipo mais grave, o entero hemorrágico (EHEC), que ocorre unicamente como O157:H7, responsável por 15% das complicações que levam a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em idosos e crianças menores de cinco anos. A SHU caracteriza-se pela destruição das células vermelhas do sangue e falência renal que pode ser acompanhada de deterioração neurológica e insuficiência renal crônica. ZIESE et al.,1996; KONEMAN et al., 2001 apud Duarte (2011).

A determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifóide, febre paratifóide, desinteria bacilar e cólera. CETESB (2010).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é analisar e quantificar a influência da área urbana na cidade de Pato Branco na qualidade da água do rio ligeiro, notadamente a contaminação microbiológica utilizando para tanto, coliformes termotolerantes como indicadores.

3. COLETAS

Como a qualidade das águas pode mudar ao longo dos períodos do ano, em função de fatores meteorológicos e da eventual sazonalidade de lançamentos de poluidores e das vazões, além de outros fatores, como temperatura, a coleta deve ser realizada com uma determinada periodicidade.

O material para análise foi coletado entre 29 de outubro 2012 e 18 de março de 2013. Foi procurado manter uma periodicidade de 21 dias, mas devido a eventos como chuvas e outros, em alguns casos, essa periodicidade se alterou, foram 06 coletas, com um espaçamento de tempo médio de 21 dias.

3.1 PONTOS DE AMOSTRAGEM.

Depois de um estudo *in loco* das características do rio em questão, onde foram levadas em consideração: marcos importantes do rio, no caso, nascente, (FIGURA 04), ou ponto mais próximo à nascente, local de início da canalização (galeria) do rio (início da área central da cidade) (FIGURA 08), local de termino da canalização (final da área central da cidade) (FIGURA 10), e limite do zoneamento urbano da cidade (FIGURA 12), facilidade de acesso e disponibilidade do recurso de forma continua.

Foram eleitos 04 pontos para a coleta de material para análise.

3.1.1 Vista geral da área de coleta

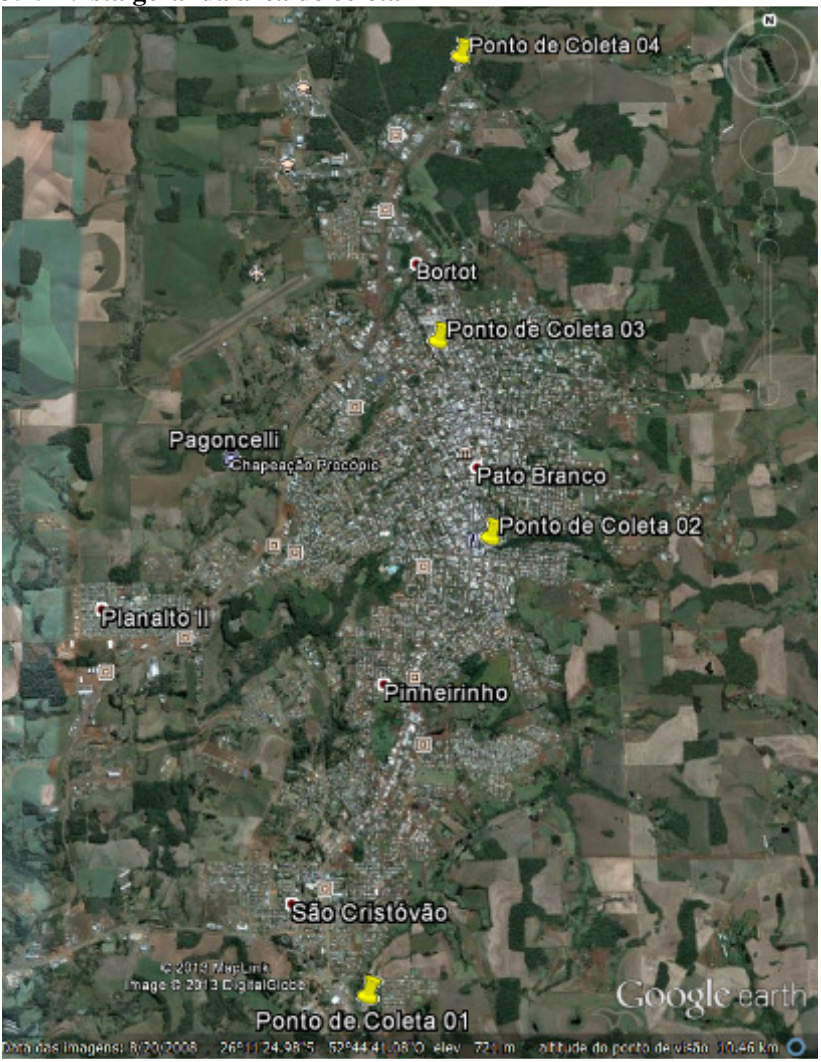


Figura 2 - Vista geral das áreas de coleta e da cidade de Pato Branco – Vista Aérea
Fonte: Google Earth

Como pode-se ver (FIGURA 02) (FIGURA 03), o curso do rio Ligeiro inicia-se no perímetro urbano de Pato Branco e segue em direção ao norte, até sair dos limites urbanos. Durante todo esse trajeto,

o rio margeia, quando não passa através o núcleo urbano da cidade de Pato Branco. Recebendo toda a sorte de contaminantes, sólidos e líquidos, não só esgoto doméstico.

Na (FIGURA 3) pode-se ver a relação entre o traçado do Rio Ligeiro(laranja), o perímetro urbano do município, delimitado pela linha magenta, e a malha viária do município(cinza). Pode-se ver também a rica diversidade de afluentes do rio ligeiro (azul).

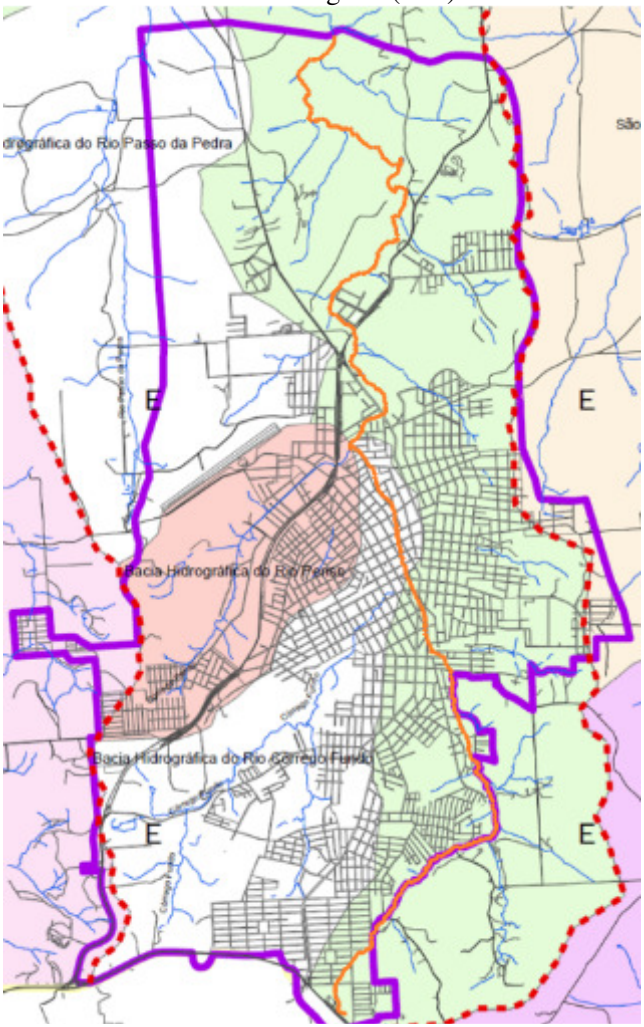


Figura 3 - Bacias Hidrográficas de Pato Branco (parcial)
Fonte: IPUPB(2010)

3.1.2 Ponto 01 - Nascente.

Coordenadas Graus/Min/Seg
26°16'24.12"S
52°40'53.91"O

Figura 4 – Ponto de coleta 01 – Vista Aérea
Fonte: Google Earth

Figura 5 - Ponto de coleta 01 – Foto nascente do rio Ligeiro
Fonte: Arquivo Pessoal

Localizada na Zona Sul da cidade (FIGURA 4), próximo à divisa com o município de Vitorino. Situa-se próximo a agrupamentos habitacionais importantes (bairros Gralha Azul e Alvorada) e candidatos à contribuintes para a poluição do curso do rio e da nascente em questão.

Região bastante desmatada, altamente povoada, a nascente encontra-se consideravelmente desprotegida da mata ciliar.

A área apresenta um grande número de residências que não têm acesso à rede coletora de esgoto, utilizando-se de fossas sépticas como destino final do esgoto doméstico, em alguns pontos, esse esgoto é lançado diretamente no rio, sem nenhum tipo de tratamento.

O ponto de coleta (FIGURA 5) foi selecionado como sendo um ponto próximo à nascente que se tem como natural do rio ligeiro. Essa atitude deve-se ao fato de a nascente ter sofrido um processo de urbanização (FIGURAS 6 e 7), onde foi construído um parque, tendo sua parte inicial represada. Continuamente houve a construção de outros dois lagos menores. Foram construídas calçadas ao redor dos lagos e dos vertedouros, um saindo do lago maior para abastecer os lagos menores. A saída, a partir dos lagos menores foi canalizada até cruzar o parque, e direcionada para uma pequena mata, onde encontra o que deveria seguir o curso original do rio.

Figura 6 - Local da Nascente oficial do Rio Ligeiro - Lago Maior
Fonte: google maps

Devido a essa intervenção, a contribuição desta nascente para o curso do rio tornou-se perene, e, portanto, perdeu o sentido para o estudo em curso, então foi localizado outro local próximo tivesse contribuição constante para o curso do rio, e deste local foi realizada a coleta das amostras.

Figura 7 - Local da Nascente oficial do Rio Ligeiro - Lago Menor
Fonte: google maps

3.1.3 Ponto 02 - Início do Enclausuramento (galeria) do Rio

Coordenadas Graus/Min/Seg
26°14'8.76"S
52°40'14.40"O

Próximo à zona central da cidade (FIGURA 8) há um lugar amplamente povoado e praticamente sem proteção da mata ciliar, que, na realidade, não passa de alguns pés de árvores, sendo que em muitos pontos simplesmente inexiste. Como nas décadas de 50 e 60, quando o local não era muito habitado, não existia praticamente nenhuma limitação quanto ao uso das margens dos rios. Segundo Schwarz (2001), a cidade, no seu desenvolvimento e ocupação do espaço, se estabelece principalmente no sentido norte-sul, acompanhando a vertente do vale do rio Ligeiro e seus afluentes.

Figura 8 - Ponto de Coleta 02 – Vista Aérea
Fonte: Google Earth

Figura 9 - Ponto de Coleta 02 - Foto
Fonte: Arquivo Pessoal

A partir desse ponto (FIGURA 9) o rio percorre aproximadamente 3,0 km sob a cidade, passando durante esse trajeto abaixo da área central da cidade, região esta que apresenta-se densamente povoada, tendo sobre ele (o rio e área marginal) diversos edifícios e uma grande área residencial e comercial.

Muitas dessas construções são dos anos 80 e 90, mas apresenta também construções do final da década de 60 e anos 70, construções essas que notadamente não apresentavam grande preocupação com a destinação dos efluentes.

Ainda, durante esse mesmo trajeto o rio ligeiro recebe águas do Córrego Fundo, praticamente dobrando o seu volume de água. (Ambos os rios tem parte de seu trajeto canalizado).

3.1.4 Ponto 03 - Final do enclausuramento do Rio

Coordenadas Graus/Min/Seg
26°13'11.38"S
52°40'32.63"O

Próximo a área central da cidade (FIGURA 10), lugar amplamente povoado.

Após sair da galeria que canalizou abaixo da área central da cidade, o rio segue canalizado com taludes de pedra por aproximadamente 300 metros para evitar o desbarrancamento.

Vegetação ciliar praticamente inexiste. Neste ponto também são facilmente notados canos de esgoto (FIGURA 11) desaguando no rio, após a faixa de taludes. Há pouca proteção por árvores.

No trecho entre P03 e P04, encontra-se o cemitério municipal, a estação de tratamento de esgoto da empresa de águas e esgotos da cidade, e um dos parques industriais da cidade. Além de o rio passar sob a BR 158, rodovia movimentada, está sujeito à cargas perigosas nas rodovias que cortam os mananciais.

Figura 10 - Ponto de Coleta 03 – Vista Aérea.
Fonte: Google Earth

Figura 11 - Ponto de Coleta 03 - Foto.
Fonte: Arquivo Pessoal

3.1.5 Ponto 04 - Saída do Rio do Perímetro Urbano

CORDENADAS
26°11'37.54"S
52°40'25.16"O

Após percorrer aproximadamente 14 km em perímetro urbano, o rio apresenta os resultados da sua passagem pela cidade. A partir desse ponto (FIGURA 12), o rio segue aproximadamente 35 quilômetros pela área rural do município até deságuar no Rio Chopin. Durante esse trajeto, em sua maioria, existe uma faixa considerável de mata ciliar, mas essa faixa é bastante variável, sendo em alguns casos praticamente inexistente, fazendo com que o rio sofra com a lixiviação das lavouras e a poluição por agrotóxicos.

Pode-se notar claramente nessa parte do rio a poluição (FIGURA 13). Sua água se torna com uma cor pardo-acinzentada e tem um forte odor. As margens do rio, principalmente nesse ponto, por formar uma espécie de calha com aproximadamente 2 metros ou mais de altura, apresentam uma grande quantidade de lixo urbano (plásticos, pneus, entre outros).

Figura 12 - Ponto de Coleta 04 – Vista Aérea
Fonte: Google Earth

Figura 13 - Ponto de Coleta 04 - Foto
Fonte: Arquivo Pessoal

Em dias de chuva, como toda a precipitação que ocorre na cidade desemboca nessa bacia, há um grande aumento do volume da água no leito do rio, fazendo que ele avance mata a dentro, espalhando todo esse material pelas margens do rio (FIGURA 13)

.

3.3 COLETA

A coleta foi realizada segundo o que preconiza as normas ABNT (1987); APHA (1999) e PRADO (2009); EMBRAPA(2004).

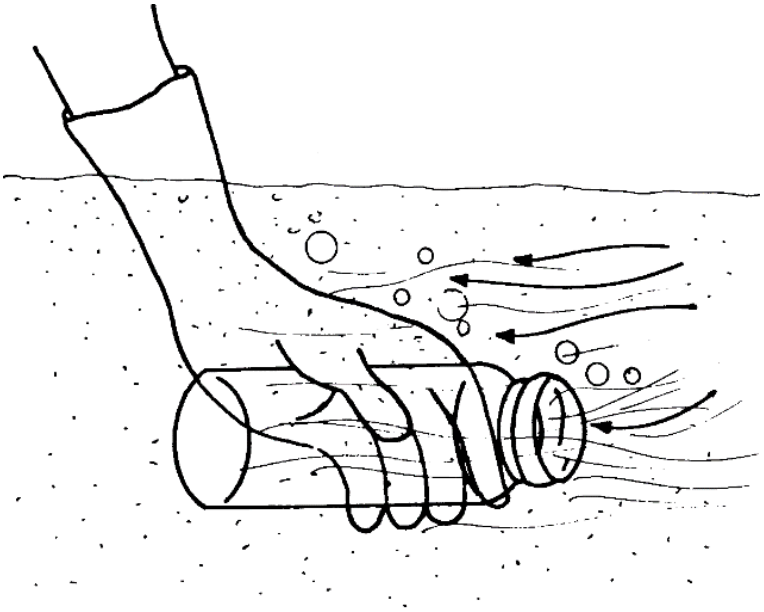


Figura 14 - Coleta manual (águas superficiais)
fonte: EMBRAPA (2004)

Remove-se a tampa do frasco com todos os cuidados de assepsia. Deve-se evitar apoiar a tampa do frasco em qualquer superfície de modo a evitar a sua contaminação. Desta forma, o responsável pela coleta deve segurar a tampa enquanto procede a amostragem.

Em seguida, o frasco é mergulhado na água, enchido e esvaziado por três vezes seguidas. Na quarta vez ele é mergulhado com a boca para baixo, a cerca de 15 a 30 centímetros abaixo da superfície da água, para evitar a entrada de contaminantes superficiais, e sua boca direcionada no sentido contrário à corrente a fim de evitar a contaminação da água com as mãos e ligeiramente voltado para cima, de modo a permitir a saída das bolhas de ar durante a entrada da água no frasco (FIGURA 14).

Inclinar o frasco lentamente para cima para permitir a saída do ar e consequente enchimento do mesmo. Após a retirada do frasco do corpo de água, desprezar uma pequena porção da amostra, deixando um espaço vazio suficiente para permitir uma boa homogeneização da amostra antes do início da análise.

Fechar o frasco imediatamente, fixando o papel protetor ao redor do gargalo, e identificar (TABELA 1) adequadamente a amostra (no frasco e na ficha de coleta)

Na amostragem de águas muito poluídas ou contaminadas, deve-se evitar que a pessoa que está coletando a amostra entre em contato direto com a mesma.

Tabela 1 -- Etiqueta de Identificação do frasco de coleta,

P01 - A	
Data	29/10/2012
Hora	16:35
T água	19,0°C
T. Amb.	31,2

De acordo com ABNT (1987), recomenda-se evitar a coleta de amostras em áreas estagnadas ou em locais muito próximos às margens.

Em cada frasco, foi assinalado, com caneta resistente à água, informações como:

- Ponto da coleta da amostra
  - P01 – Nascente;
  - P02 – Inicio enclausuramento;
  - P03 – Final Enclausuramento;
  - P04 – Saída da área urbana;
- Identificação da amostra
  - A – Primeira Coleta do Ponto;
  - B –Segunda Coleta do Ponto;
  - C –Terceira Coleta do Ponto;
- Data da coleta amostra;
- Horário da coleta amostra;
- Temperatura da água (no ponto de coleta);
- Temperatura ambiente;

3.4 TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Manter as amostras entre 1°C e 4°C preservará a maioria de características físicas, químicas e biológicas em curto prazo (< 24 horas) e como tal é recomendado para todas as amostras entre coleta e entrega para o laboratório.

É recomendado para amostras microbiológicas ser refrigerada entre 2°C e 10°C. O gelo pode ser rapidamente usado para resfriar amostras para 4°C antes do transporte.

As barras de gelo reutilizáveis são preferidas ao invés de gelo solto. Lembrando-se sempre que o gelo não deve entrar em contato com as amostras (APHA, 1998).

4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após as amostras serem coletadas, as mesmas foram levadas no mesmo dia para o laboratório de Biologia do Polo EAD da cidade de Pato Branco, onde foram submetidas ao Método dos Tubos Múltiplos, afim de determinar o NMP de EC para as mesmas amostras.

Os meios de cultura foram preparados e os testes realizados segundo os critérios adotados e descritos pela APHA (1999); ISO 4831 (2006) e os manuais dos respectivos meios de cultura.

Materiais necessários:

a) Tubo de ensaio.
b) Estante para tubo de ensaio.
c) Tubo de Durham.
d) Pipeta graduada de 10 ml.
e) Pipeta graduada de 1 ml.
f) Bico de Bunsen ou lamparina a álcool.
g) Caldo Lauryl Triptose.
h) Caldo Agar Bile Verde Brilhante Bile a 2%.
i) Caldo EC
j) Água de diluição.
k) Alça de platina.
l) Estufa bacteriológica.
m) Balança de Precisão.
n) Câmara laminar de fluxo.

4.1 TESTE PRESUNTIVO PARA COLIFORMES:

Realizado através do Caldo de Lauryl Triptose.

O Caldo Lauryl Triptose foi formulado por Mallmann Darby tabela 02:

Recomendado pela APHA(2003) para detecção presuntiva de coliformes na água, efluentes e esgoto pelo teste NMP e para detecção de coliformes em alimentos;

Tabela 2 - Composição caldo Lauril Triptose em g/l

Caldo Lauril Triptose CLT	
Triptose:	20.00
Fosfato Dipotássico:	2.75
Cloreto de Sodio:	5.00

Lactose:	5.00
Fosfato Monopotássico:	2.75
Lauril Sulfato de Sódio:	0.10

4.1.1 Preparação do meio de cultura

Dissolver os componentes ou o meio completamente desidratado em água, aquecendo, se necessário.

Distribuir o meio em quantidades de 10 ml em tubos de ensaio, contendo tubos de Durham invertidos.

Remover o ar contido nos tubos de Durham.

Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 min. Os tubos de Durham não deverão conter bolhas de ar após a esterilização.

4.1.2 Preparação das amostras

Antes de inocular cada tubo, foi verificado se o tubo de Durham em seu interior não continha bolhas.

Após essa etapa, foram colocadas, com o auxílio de uma pipeta graduada(FIGURA 15), 10ml de amostra do frasco A do ponto 01 em um tubo de ensaio, e o mesmo foi identificado como P01-A-10.

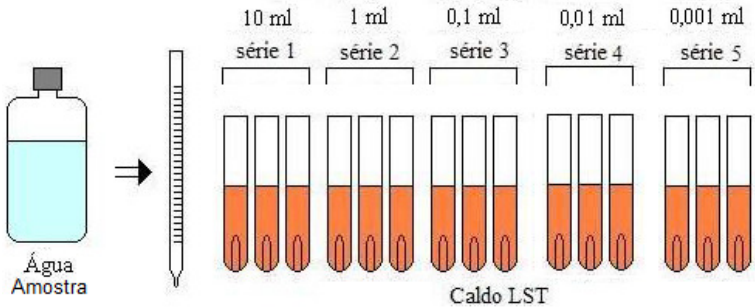


Figura 15 - Esquema de distribuição das amostras.
Fonte: adaptado de CERQUEIRA & SANT' ANA(2007)

Em seguida foi inoculado 1 ml de amostra do frasco A do ponto 01 em um tubo de ensaio, e o mesmo foi identificado como P01-A - 01. Por fim foi inoculado 0,1 ml de amostra do frasco A do ponto 01 em um tubo de ensaio, e o mesmo foi identificado como P01-A 0,1(TABELA 3).

As pipetas graduadas utilizadas nessa etapa foram descartadas, para que não houvesse a possibilidade de contaminação e o processo seguiu adiante até que todas as amostras tivessem sido inoculadas

Tabela 3 - Identificação dos tubos de ensaio com as amostras

Coleta	Amostra	Quantidade de amostra inoculada	Identificação
P01	A	10ml	P01-A 10
P01	A	1ml	P01-A 1
P01	A	0,1ml	P01-A 0,1
P01	A	0,01ml	P01-A 0,01
P01	A	0,001ml	P01-A 0,001
P01	B	10ml	P01-B 10
P01	B	1ml	P01-B 1
P01	B	0,1ml	P01-B 0,1
...	...	...	...continua até inocular todas as amostras
A amostragem é feita em triplicata.			

4.1.3 Quantidade de Tubos de ensaios testados

Quanto a quantidade de tubos de ensaio testados, foram determinados 04 pontos de coleta (P01, P02, P03 e P04) para cada ponto de amostragem foram realizadas três coletas (A,B,C), para cada amostra (coleta) foram determinadas 05 diluições (10ml, 1ml e 0,1ml, 0,01ml e 0,001ml) e para cada diluição foi feita uma triplicata, o que resultou em um total de 180 tubos analisados

.

4.1.4 Incubação

Após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa a uma temperatura de 37°C ± 0,5°C por um período de 24 horas ± 2 h.

Após esse período os tubos foram checados visualmente para verificar se o meio de cultura apresentava opacidade, ou a presença de a presença de gás nos tubos de Durham. A opacidade do meio de cultura e/ou a presença de gás nos tubos de Durham (FIGURA 16 e 17), a partir da fermentação da lactose significa que foram positivados, e presumivelmente há bactérias do grupo coliforme na amostra analisada.

Caso, após o período de 24 horas, os tubos que não positivarem deverão ser incubados por mais 24 horas, após esse período, considerasse os tubos que não apresentaram a formação de gás nos tubos de Durham como negativados.

Figura 16 - Tubo Positivado - Produção de gás(tubo da direita).
O tubo da esquerda mostra-se negativado

Figura 17 - Tubo positivado – Opacidade
Fonte: Arquivo Pessoal.

Um limite arbitrário de 48 horas para observação, sem dúvida, exclui os membros ocasionais do grupo coliforme que crescem muito lentamente (APHA, 2001)

O teste é dito presuntivo porque além de coliformes, outras bactérias não pertencentes à esse grupo podem fermentar a lactose e produzir gás (SILVA,2011).

4.2 TESTE CONFIRMATIVO PARA COLIFORMES

A confirmação para coliformes é feita através caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação em estufa a uma temperatura de 37°C ± 0,5°C por um período de 48 horas ± 2 h.

O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição (TABELA 4) bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), sais de bile inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, especialmente bacilos e *Streptococcus* fecais. (APHA, 1998), permitido, assim, que apenas os microrganismos Gram negativos, os coliformes, se desenvolvam.

Tabela 4 - Composição caldo VBB em g/l

Caldo VBB

Digestão Péptica de tecido animal	10 g
Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$)	10 g
Bile bovina Desidratada	20 g
Verde Brilhante	0,0133 g

4.2.1 Preparação do meio de cultura

Dissolver os componentes ou o meio completamente desidratado em água, por aquecimento, quando se fizer necessário.

Distribuir o meio em quantidades de 10 ml em tubos de ensaio de cerca de 16 mm x 160 milímetros, contendo tubos de Durham invertidos.

Remover o ar contido nos tubos de Durham.

Esterilizar em um conjunto autoclave a 121 °C durante 15 min. Os tubos de Durham não devem conter bolhas de ar após a esterilização.

4.2.2 Preparação das amostras

Esta etapa foi realizada em uma câmera laminar de fluxo, após os meios de cultura estarem em temperatura ambiente, com o auxílio de uma alça de platina que foi previamente flambada no bico de Bunsen, foi realizada uma alçada do tubo que havia sido positivado no teste presuntivo de coliformes e transferido para o tubo preparado com o meio de cultura VBB (FIGURA 18). O procedimento se repetiu para cada tubo que havia sido positivado no teste anterior

Cada tudo recebeu a mesma identificação que havia no tubo com o caldo de lauryl-triptose (etapa anterior) que havia apresentado resultado positivo.

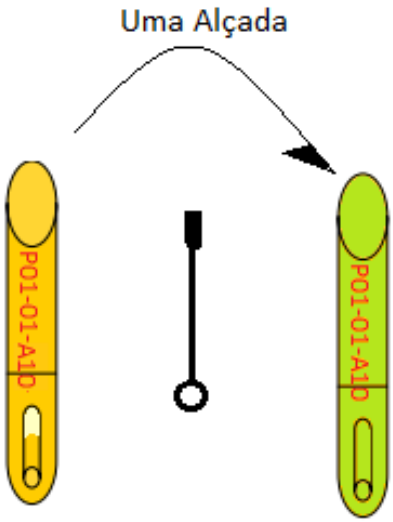


Figura 18 - Procedimento para inoculação no caldo VBB
fonte: Arquivo Pessoal

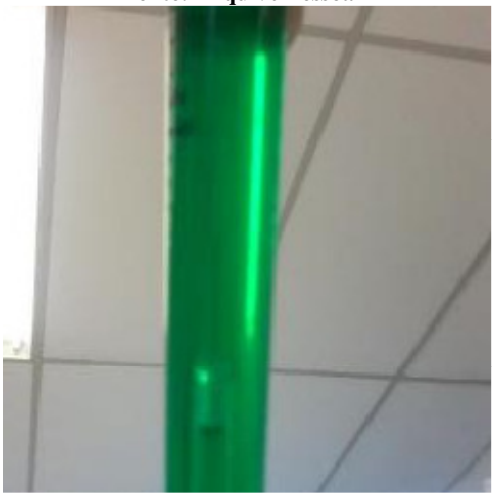


Figura 19 - Caldo VB – Positivado (produção de gás)
fonte: arquivo pessoal

Assim como na etapa anterior, após o período de incubação em estufa, os tubos de ensaio foram checados visualmente para a presença de gás nos tubos de Durham (FIGURA 19), a presença de gás, a partir da fermentação da lactose significa que foram positivados e há bactérias do grupo coliforme na amostra analisada.

4.3 TESTE PARA COLIFORMES TERMO TOLERANTES

A confirmação para coliformes termo tolerantes é feita através da inoculação do material dos tubos positivados no teste VBB para o Caldo EC.

A triptose e caseína enzimática hidrolisada fornecem os nutrientes de crescimento essenciais. Lactose é um açúcar fermentável. A mistura de sais de bile inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, especialmente bacilos e *Streptococcus* fecais Fosfatos de potássio controlam o pH durante a fermentação da lactose (TABELA 5).

Tabela 5 - Composição caldo EC em g/l

Caldo EC	
Caseína Enzimática Hidrolizada	20.0 g
Lactose	5.0 g
Mistura de Sais Biliares	1.5 g
Fosfato Dipotássico, K_2HPO_4	4.0 g
Fosfato Monopotássico, KH_2PO_4	1.5 g
Cloreto de Sódio, NaCl	5.0 g

4.3.1 Preparação do meio de cultura

Dissolver os componentes ou o meio completamente desidratado em água, por aquecimento, se necessário.

Distribuir o meio em quantidades de 10 ml em tubos de ensaio de cerca de 16 mm x 160 milímetros, contendo tubos de Durham invertidos.

Remover o ar contido nos tubos de Durham.

Esterilizar em um conjunto autoclave a 121 °C durante 15 min. Os tubos de Durham não devem conter bolhas de ar após a esterilização.

4.3.2 Preparação das amostras

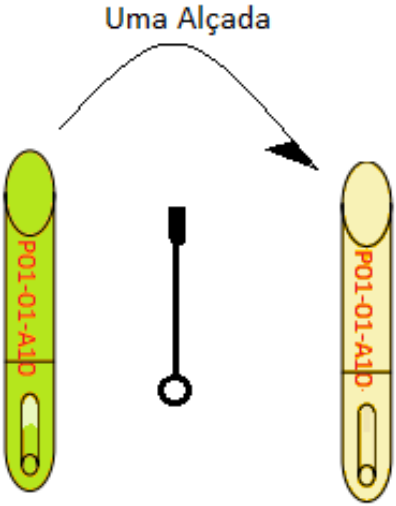


Figura 20 - Procedimento Inoculação
fonte: arquivo pessoal

Esta etapa é realizada em uma câmera laminar de fluxo, após os meios de cultura estarem em temperatura ambiente, com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada no bico de Bunsen a fim de esteriliza-la, é realizada uma alçada do tubo que havia sido positivado no teste confirmativo para coliformes (caldo verde brilhante – VBB) e transferido para o tubo preparado com o meio de cultura caldo EC (FIGURA 20). O procedimento se repete para cada tubo que havia sido positivado no teste anterior.

Cada tudo recebe a mesma marcação que havia no tubo com o caldo verde bile brilhante VBB que havia sido positivado.

Assim como na etapa anterior, após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa B.O.D. só que agora à uma temperatura de 44,5ºC ± 0,2ºC por um período de 24 horas, afim de detectar a presença de bactérias que resistam à essa temperatura.

Figura 21 – Caldo EC – Esquerda negativado – direita positivado (produção de gás)
Fonte: arquivo pessoal

Após esse período os tubos foram checados visualmente para a presença de gás nos tubos de Durhan, a presença de gás (FIGURA 21), a partir da fermentação da lactose significa que foram positivados e há bactérias termo tolerantes (*Escherichia* coli) na amostra analisada.

RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA COLETA

Coleta realizada no dia 29 de outubro 2012, os testes de laboratório foram realizados entre os dias 29 de outubro 2012 e 03 de novembro de 2012.

A primeira análise foi realizada utilizando o Método dos Tubos múltiplos, com três diluições diferentes, em um tubo contendo 10 ml de meio de cultura, foi inoculado 10 ml de amostra em outro 1ml e no último 0,1ml de amostra.

Para cada amostra, foi realizada uma triplicata, ou seja, foram inoculados em três tubos de meio de cultura as quantidades acima especificadas.

Com os dados desta primeira coleta em mãos, como o número de positivos foi muito alto, decidimos aumentar as diluições a partir da segunda, passando então à utilizar o método dos tubos múltiplos (MTM) com 0,1ml, 0,01ml, 0,001ml de amostra para cada tubo contendo 10ml

de meio de cultura (Caldo Lauril Triptose). Cada teste sempre realizado em triplicata.

Tabela 6 - Dados relativos à primeira coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 1	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	>1100	>1100	>1100	>1100
Confirmativo	>1100	>1100	>1100	>1100
EC	>1100	>1100	>1100	>1100

Confrontando os dados coletados, com a Tabela do Número Mais provável (NMP) (ANEXO A), chegamos aos seguintes resultados:

Todas as amostras dos pontos analisados apresentam um grau de contaminação semelhante, apresentando valores acima de 1100 unidades por 100ml de água.

5.2 Segunda Coleta

Tabela 7 - Dados relativos à segunda coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 2	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	110.000	>110.000	>110.000	>110.000
Confirmativo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
EC	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000

A coleta realizada no dia 11 de novembro 2012 e os testes de laboratório foram realizados entre os dias 12 de novembro 2012 e 17 de novembro de 2012.

Apesar de o número de diluições ter aumentado, o resultado foi igualmente alarmante, para essa segunda coleta tivemos os seguintes resultados baseados na tabela de NMP:

Para o primeiro ponto de coleta, para o teste de coliformes termo tolerantes foi constatado um NMP de 110.000 NMP/100ml, com um intervalo de confiança entre 18000 e 410000 NMP/100ml, para todos os outros pontos de coleta o resultado foi maior que 110.000 NMP/100ml.

5.3 Terceira Coleta

Tabela 8 - Dados relativos à terceira coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 3	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
Confirmativo	110.000	>110.000	>110.000	>110.000
EC	110.000	>110.000	>110.000	>110.000

A coleta realizada no dia 10 de dezembro 2012 e os testes de laboratório foram realizados entre os dias 10 de dezembro 2012 e 15 de dezembro 2012.

Para o primeiro ponto de coleta, foi constatado um NMP de 110.000 NMP/100ml para o teste confirmativo de coliformes e o de coliformes termo tolerantes, para todos os outros pontos de coleta, o resultado foi maior que 110.000 NMP/100ml.

5.4 QUARTA COLETA

Tabela 9 - Dados relativos à quarta coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 4	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
Confirmativo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
EC	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000

Coleta realizada no dia 14 de janeiro 2013, o os testes de laboratório foram realizados entre os dias 14 de janeiro 2013 e dia 19 janeiro 2013.

Para todos pontos de coleta, o resultado foi maior que 110.000 NMP/100ml

.

5.5 QUINTA COLETA

Tabela 10 – dados relativos à quinta coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 5	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
Confirmativo	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000
EC	>110.000	>110.000	>110.000	>110.000

A coleta realizada no dia 11 de fevereiro de 2013 e os testes de laboratório foram realizados entre os dias 11 de fevereiro de 2013 e 11 de fevereiro de 2013.

Para todos os pontos de coleta, o resultado foi maior que 110.000 NMP/100ml.

5.6 SEXTA COLETA

Tabela 11 - dados relativos à sexta coleta - NMP/100ml de amostra

Coleta 6	P01	P02	P03	P04
Presuntivo	21000	110.000	>110.000	>110.000
Confirmativo	1500	110.000	>110.000	>110.000

EC	920	42000	>110.000	>110.000

A coleta realizada no dia 18 de março de 2013 e os testes de laboratório foram realizados entre os dias 18 de março de 2013 e 23 de março de 2013.

Houve um intervalo maior que a média estipulada (21 dias), pois o início de mês de fevereiro foi muito chuvoso, e definimos que faríamos coletas apenas com um prazo mínimo de 48h após ter ocorrido precipitações pluviométricas, provavelmente por causa das chuvas em excesso neste motivo, tivemos um resultado bastante diverso dos visualizados nas coletas anteriores.

Para o primeiro ponto de coleta, tivemos os seguintes resultados, presuntivo para coliformes, 21.000 NMP/100ml. Confirmativo para coliformes, 1500 NMP/100ml. E para bactérias termo tolerantes, 920 unidades/100ml.

Para o segundo ponto de coleta, presuntivo para coliformes, 110.000 NMP/100ml. Confirmativo para coliformes, 110.000 NMP/100ml e para bactérias termo tolerantes, 460 NMP/100ml.

Para todos os outros pontos de coleta, o resultado foi maior que 110.000 NMP/100ml.

CONCLUSÕES

Ao iniciarmos este trabalho, esperávamos mostrar a influência da porção urbana da cidade de Pato Branco sobre o Rio Ligeiro, de maneira especial, a contaminação através de coliformes. Esperávamos que o rio apresentasse um gradiente ascendente de poluição, iniciando relativamente preservado em sua nascente, e, gradualmente aumentando até chegar na saída da área urbana com um valor mais elevado.

O rio desde a nascente até o ponto que deixa a área urbana apresenta águas com um alto grau de contaminação por coliformes termotolerantes, acima de 110.000 NMP/100ml de amostra. O que segundo os critérios utilizados pelo CONAMA (2005), classifica o Rio Ligeiro como classe IV para as suas águas quanto ao critério de contaminação bacteriológica, tendo os coliformes como indicadores.

As possíveis causas desta contaminação podem ser o despejo direto, sem tratamento de esgoto doméstico no rio, a infiltração do material de fossas sépticas e de sumidouros (muito comuns na região) que comprometem o lençol freático, defeitos na canalização ou ainda contato direto com fezes humanas ou de animais endotérmicos.

Depois de conhecer *in loco* as condições do rio e das áreas por onde o rio passa, e com os resultados dos testes acima, fica evidente que a rede coletora de esgoto da cidade não é suficientemente ampla para evitar esses tipos de despejos no rio.

Entre os pontos que ousamos sugerir para redução destes problemas, está em primeiro lugar uma ampla campanha de conscientização, mostrando para a sociedade a situação do rio, pois ao nosso ver, sem a participação ativa da comunidade, qualquer atitude que o poder público venha a tomar será de sucesso limitado, também estão entre as ações sugeridas, o aumento do acesso de domicílios à rede coletora de esgoto, eliminação das fossas sépticas, a recuperação da mata ciliar na porção urbana e a criação de parques lineares nas áreas já urbanizadas.

REFERÊNCIAS

ABNT - NBR 9898 - **Preservação e técnicas da amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**: procedimento. Rio de Janeiro, 1987.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Baltimore, Maryland: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 1998

APHA. 9221- **Multiple-Tube Fermentation Technique for Members of the Coliform Group**. 20 ed. Baltimore, Maryland: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), June 2003

APHA. 9221b- **Standard Methods 9221b. Standard Total Coliform Fermentation Technique**. Reprinted by Permission from the 20th Edition. Baltimore, Maryland: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 2003 draft

BRUNN et al. **Cities of the World: World Regional Urban Development** – 3rd ed., 2003 Stanley D. Brunn, Jack Francis Williams,Donald J. Zeigler

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 518**, de 25.03.04. **Dispõe sobre normas e padrões de potabilidade de água para consumo humano**. Brasília: SVS, 2004.

BRASIL. CONAMA. **Portaria Nº 357/2005**, de 18/03/2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília: MMA, 2005.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água** 2ª ed. rev. Brasília: Funasa, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano /** Ministério

da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006

CERQUEIRA, Aloysio de Mello Figueiredo; SANT'ANNA, Raquel de Souza. **Apostila de Aulas Práticas – Bacteriologia – Nutrição**, Universidade Federal Fluminense, Instituto biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rio de Janeiro, 2007

DUATE, Ana Paula. **Microrganismos Indicadores de Poluição Fecal em Recursos Hídricos**, Belo Horizonte, 2011

EMBRAPA. **Manual Técnico de Coleta, Acondicionamento, Preservação e Análises Laboratoriais de Amostras de Água para fins Agrícolas e Ambientais.** Rio de Janeiro : Embrapa Solos. 2004

FABER, M. E. E. **A Importância dos Rios para as Primeiras Civilizações.** Disponível em: <http://www.historialivre.com/antiga/importancia_dos_rios.pdf> Acesso em 10/11/ 2012.

FDA – **Bacteriological Analytical Manual** Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions – Washington September 2002 disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm#tab1 > acesso em 10/05/2013

FILHO, F. M. A; SILVA, L. M. - **Avaliação das concentrações de coliformes no afluente e efluente da ETE Goiânia em 2007**. Universidade Católica de Goiás, Departamento de Engenharia Ambiental - Goiânia, 2008. Orientador Profº MSc. Leandro Morais e Silva.

GORSKI, M C B. **Rios e cidades** | Ruptura e reconciliação. Senac. São Paulo, 2010

IPPUPB – Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Pato Branco. Revisão do Plano Diretor de Pato Branco, Paraná. 2006

JABUR, A. S. **Alterações Hidrológicas Decorrentes de Mudança do Uso e Ocupação do Solo na Bacia Hidrográfica do Alto Rio Ligeiro, Pato Branco - PR**. Curitiba. UTFPR – Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-

Graduação em Engenharia Florestal. 2010 Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Eduardo Rizzi

McCRADY, M.H. **The numerical interpretation of fermantation-tubes results. Journal of Infection Disease**, Illinois, v.17, p.183-212, 1915.

MADIGAN, Michael T. et al**. Microbiologia de Brock.** 10. ed Tradução e revisão técnica Cyntia Maria Kyaw. São paulo: Prentice Hall, 2010

MELO, Syomara Ker de. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Eschericha coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce –** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Orientadora Profª. Drª. Maria Célia S. Lanna

Nogueira, A. V. **Microbiologia /** Alexandre Verzani Nogueira, Germano Nunes Silva Filho. – Florianópolis : Biologia/EaD/UFSC, 2010

PASTER,L. **L'Age nouveau**, Edições 99-104 – Página 66, 1957

PRADO, R. B. **Manual técnico de coleta, acondicionamento, preservação e análises laboratoriais de amostras de água para fins agrícolas e ambientais /** Rachel Bardy Prado, Sílvio Roberto de Lucena Tavares. - Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2004.

POPE, M.L; et al. **Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on Escherichia coli Densities in Surface Water Samples**. Appl Environ Microbiol. October; 69(10): 6201–6207, 2003.

REBOUÇAS A. C. e outros, **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 2 edição; São Paulo. Escrituras Editora. 2002.

REVISTA BIO. **Padrão de qualidade da água de novo na berlinda**. Rio de Janeiro, ano IX, n° 4, p. 39-41, set.-dez., 1997.

ROSEN, G. **A evolução da medicina social**. In: NUNES, E. D. (org.), Medicina Social: Aspectos Históricos e Teóricos. São Paulo: Global. p. 25-72, 1983.

SILVA, A e outros, **Determinação de Coliformes Termotolerantes e Coliformes Totais**, UFRJ, 2011 disponível em <http://pt.scribd.com/doc/86293754/Coliformes> acesso em 02/11/2012

SILVA, E. R., **Um percurso pela história através da água: passado, presente, futuro**, UFRJ, 2000 XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental disponível em <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/saneab/xi-009.pdf> acesso em 02/04/2013

SOUZA, L. C. et al**. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais**. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 1983.

SCHWARZ, W. **Estudo da expansão urbana como subsídio a análise ambiental aplicado a cidade de Pato Branco – PR**. Florianópolis, SC – UFSC, Pós-Graduação em Engenharia de Produção, 2001. Dissertação: Mestrado em Engenharia de Produção, Orientadora: Drª .Ana Maria Bencciveni Franzoni.

URBAN WORLD. **Waiting for a solution**. Frank Rijsberman Volume IV Issue 04 December 2011 disponível em: <http://www.unhabitat.org/pmss/getElectronicVersion.aspx?nr=3263&alt=1> acesso em 01/11/12

UNICEF/WHO, Diarrhoea: **Why children are still dying and what can be done**, 2009 disponível em: <http://www.unicef.org/media/files/Final_Diarrhoea_Report_October_2009_final.pdf> acesso em 02/11/12

VALIAS et al. **A Água que Consumimos - Município: Águaí** – SP. XII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas (2002) disponível em: < http://águassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/22328/14671> acesso em 25/09/12

WHO World Health Organization. **Guidelines for Drinking Water Quality**, 4yh edition,. Geneva: WHO; 2011

ANEXO A - TABELA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) –SÉRIES DE TRÊS TUBOS

Tabela do Número Mais provável (NMP) e 95% de intervalo de confiança para séries de 3x0,1 ml, 3x0,01ml e 3x0,001ml da amostra

Combinação dos Tubos Positivos			NMP/g ou /ml	Limite de Confiabilidade	
0,1	0,01	0,001		Mínimo	Máximo
0	0	0	<3,0	–	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1.000

3	3	0	240	42	1.000
3	3	1	460	90	2.000
3	3	2	1100	180	4.100
3	3	3	>1100	420	–

Fonte (FDA, 2010) adaptado

OBS: Para obter o NMP/g ou ml, para séries de 3 tubos, com inóculos de 10ml, 01ml e 0,1ml, e respectivos intervalos de confiança 95%, dividir por 100 os valores da correspondente ao arranjo de tubos positivos obtido na análise.

A tabela apresenta o NMP/1ml de amostra, para confrontar com os padrões da CONAMA, multiplicar o valor encontrado por 100.

ANEXO B – PORTARIA 518/2004 MINISTÉRIO DA SAÚDE

ão microbiológico de potabilidade da água para consumo hu

Parâmetro	VMP[1]
para consumo humano[2]	
ichia coli ou coliformes tolerantes[3]	Ausência em 100ml
na saída do tratamento	
rmes totais	Ausência em 100ml
tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
ichia coli ou coliformes tolerantes[3]	Ausência em 100ml
rmes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por m Ausência em 100ml em 95% das amostras exam no mês. Sistemas que analisam menos de 40 amostras po Apenas uma amostra poderá apresentar mensa resultado positivo em 100ml.

(1) valor máximo permitido.
(2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluind individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.
(3) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

Fonte: Portaria n. 518, de 25.03.04 Brasil (2004)

ANEXO C - RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357/2005

"Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.". - Data da legislação: 17/03/2005

Seção I
Das Águas Doces
Art. 4o
As águas doces são classificadas em:
I - classe especial: águas destinadas:
a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção;
b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e,
c) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas:
a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado;
b) à proteção das comunidades aquáticas;
c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000;
d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e
e) à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
* Não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros

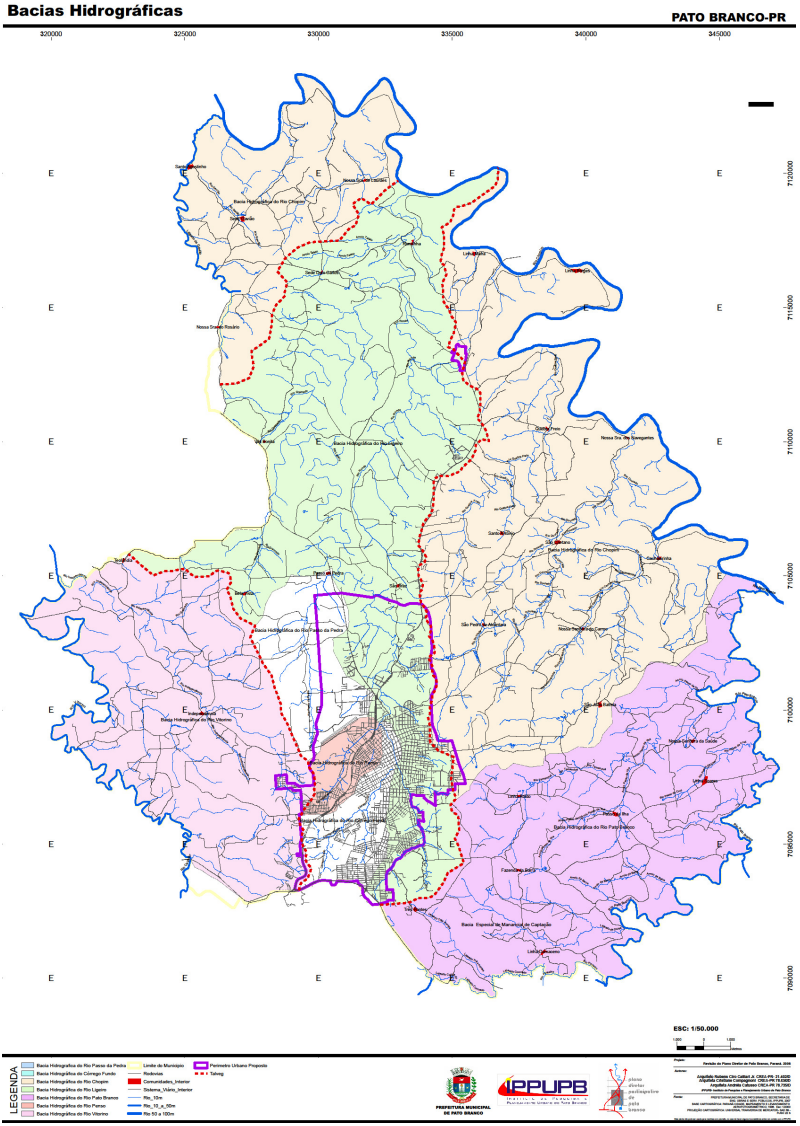
III - classe 2: águas que podem ser destinadas:
a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
b) à proteção das comunidades aquáticas;
c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000;
d) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e
e) à aqüicultura e à atividade de pesca.

* Não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas:
a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
c) à pesca amadora;
d) à recreação de contato secundário; e (Para o uso de recreação de contato secundário não deverá ser excedido um limite de 2500 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras,coletadas durante o período de um ano, com freqüência bimestral.)
e) à dessedentação de animais. (Para dessedentação de animais criados confinados não deverá ser excedido o limite de 1000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com freqüência bimestral.)
* Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 4000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral

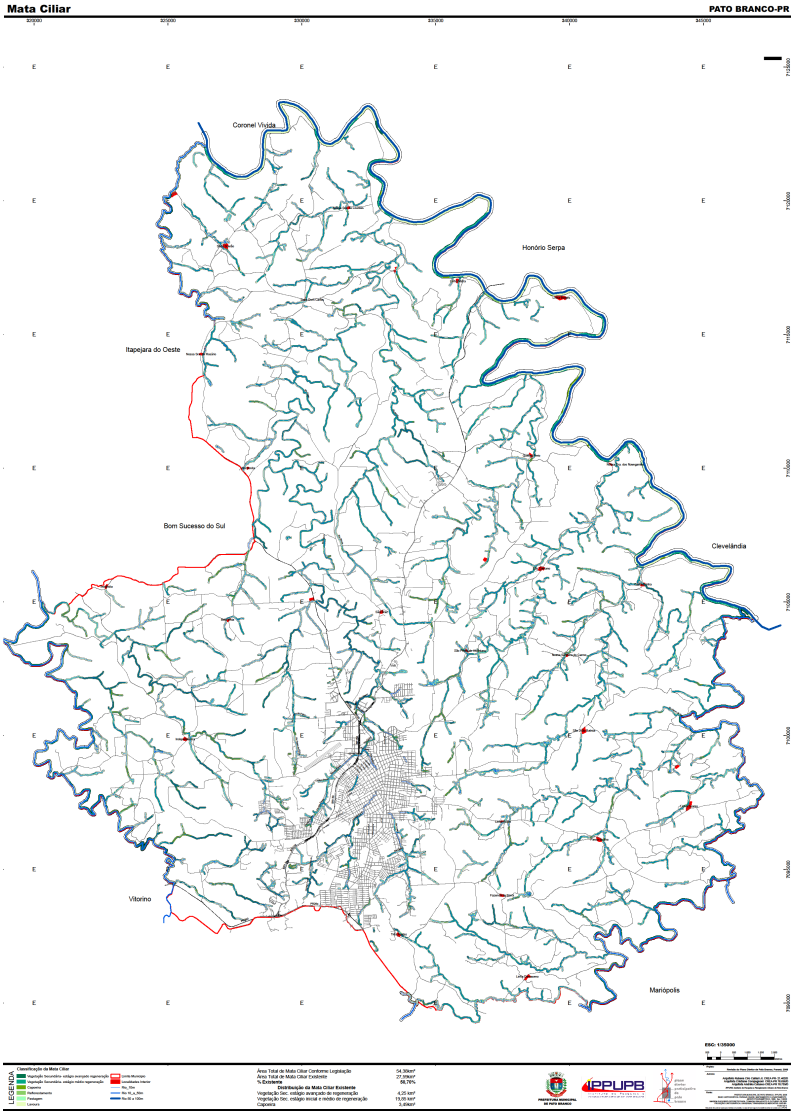
V - classe 4: águas que podem ser destinadas:
a) à navegação; e
b) à harmonia paisagística
fonte: CONAMA (2005) Adaptado

ANEXO D - BACIAS HIDROGRÁFICAS DE PATO BRANCO



Fonte: IPPUPB(2006)

ANEXO E - MAPEAMENTO MATAS CILIARES DO MUNICÍPIO DE PATO BRANCO



Fonte: IPPUPB(2006)