

1271

N.º 4

1906

Sôbre os modernos processos de analyse bacteriologica das aguas

*Dissertação inaugural apresentada
à Escola Medico-Cirurgica do Porto*

POR

Manoel Augusto Pinto



PORTO

TYPOGR. DA EMPREZA "ARTES & LETTRAS,"
2—Rua da Fabrica—10

1906

130/4 EHC

Escola Medico-Cirurgica do Porto

DIRECTOR

ANTONIO JOAQUIM DE MORAES CALDAS

SECRETARIO-INTERNO

JOSÉ ALFREDO MENDES DE MAGALHÃES

CORPO DOCENTE

Lentes Cathedaticos

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1. ^a Cadeira—Anatomia descrip-
tiva geral | Luiz de Freitas Viegas. |
| 2. ^a Cadeira—Physiologia. . . . | Antonio Placido da Costa. |
| 3. ^a Cadeira — Historia natural
dos medicamentos e mate-
ria medica. | Illydio Ayres Pereira do Valle. |
| 4. ^a Cadeira—Pathologia externa
e therapeutica externa | Antonio Joaquim de Moraes Caldas. |
| 5. ^a Cadeira—Medicina operato-
ria | Clemente J. dos Santos Pinto. |
| 6. ^a Cadeira — Partos, doenças
das mulheres de parto e
dos recém-nascidos. | Candido Augusto Corrêa de Pinho. |
| 7. ^a Cadeira—Pathologia interna
e therapeutica interna. | José Dias de Almeida Junior. |
| 8. ^a Cadeira—Clinica medica. . . . | Antonio d'Azevedo Maia. |
| 9. ^a Cadeira—Clinica cirurgica . . | Roberto B. do Rosario Frias. |
| 10. ^a Cadeira — Anatomia patho-
logica | Augusto H. d'Almeida Brandão. |
| 11. ^a Cadeira—Medicina legal. . . . | Maximiano A. d'Oliveira Lemos. |
| 12. ^a Cadeira — Pathologia geral,
semeiologia e historia me-
dica. | Alberto Pereira Pinto d'Aguiar. |
| 13. ^a Cadeira—Hygiene. | João Lopes da S. Martins Junior. |
| 14. ^a Cadeira—Histologia normal | José Alfredo Mendes de Magalhães |
| 15. ^a Cadeira — Anatomia topo-
graphica | Carlos Alberto de Lima. |

Lentes jubilados

- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| Secção medica. | José d'Andrade Gramaxo. |
| Secção cirurgica | } Pedro Augusto Dias. |
| | } Dr. Agostinho Antonio do Souto. |

Lentes substitutos

- | | |
|----------------------------|------------------------------------|
| Secção medica | } Thiago A. d'Almeida. |
| | } Joaquim A. Pires de Lima. |
| Secção cirurgica | } Antonio Joaquim de Souza Junior. |
| | } Vaga. |

Lente demonstrador

- | | |
|----------------------------|-------|
| Secção cirurgica | Vaga. |
|----------------------------|-------|

A Escola não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação e enunciadas nas proposições.

(Regulamento da Escola, de 23 d'abril de 1840, art. 155.º)

A meus Paes

Aos Ill.^{mos} Professores

Souza **J**unior

e

Antonio de **M**agalhães

muito reconhecidamente.

Ao meu presidente de these

o Ill.^{mo} Sr.

Prof. **C**andido de **D**inho

A importancia dos estudos sanitarios, á medida que melhor vão sendo conhecidas d'uma maneira positiva as condições etiologicas das doenças, e por consequencia a sua prophylaxia, torna-se cada vez maior.

E se algum ramo dos modernos conhecimentos, pelos enormes progressos realizados, efficazmente tem contribuido para as praticas de prophylaxia, esse é a bacteriologia.

Um dos problemas que com mais interesse esta sciencia desde ha muito se esforça por resolver é, com certeza, o da analyse sanitaria das aguas.

Demonstrada, pelos estudos da escola franceza, principalmente, (Brouardel, Thoinot, Chantemesse, Widal, Proust, Wurtz, etc.) a influencia, sobre as epidemias de febre typhoide, da agua de alimentação, e a sua propagação por meio d'ella, a attenção dos hygienistas incidiu sobre a pesquisa nas aguas, do agente etiologico d'essa doença.

Mas como, por condições especiaes de que adiante fallarei, o bacillo d'Eberth difficil e raramente se encontra nas aguas, mesmo n'aquellas que por outras considerações, com segurança podemos affirmar serem o vector do contagio, foram os methodos bacteriologicos de analyse d'aguas depois d'um periodo d'enthusiasmo exagerado e prematuro declarados em falencia, e durante algum tempo desprezados.

As investigações não pararam, porém; e ao cabo de muitas e pacientes pesquisas, sobretudo feitas na Allemanha e na America do Norte, surgem novos methodos, que, pela sua certeza e delicadeza, resolvem o problema, fornecendo um valioso criterio da potabilidade d'uma agua.

* * *

O numero e a distribuição das bacterias depende de muitas condições, entre as quaes avulta a quantidade das substancias que lhes servem de alimento; não tendo, como as plantas verdes, a propriedade de se nutrir á custa de materias inorganicas, desempenham o importante papel de, actuando sobre as substancias organisadas, as mineralisar, transformando-as em compostos de que essas plantas se podem utilizar para o seu crescimento.

Vivendo sobretudo á custa das materias organicas mortas, (dejectos dos animaes, cellulas e tecidos mortos de animaes e plantas) encontram-se diffundidas sobre toda a superficie da terra e tanto mais numerosas, quanto maior fôr a abundancia d'essas substancias.

E' n'este facto que está a explicação das differenças do contheudo bacteriano das aguas; assim, a agua da chuva, isenta de microbios na occasião em que se condensa, já na queda se carrega d'aquelles que encontra em suspensão na atmosphera; logo, porém, que tocam no solo, como é nas camadas superficiaes d'este, que pela enorme abundancia de alimentos, maior numero de bacterias se encontra, as gottas de chuva massivamente se inquinam, de modo a poder-se contar na agua que lavou um campo de cultivo, ou na que se escôa na vallêta d'uma estrada, centenas de milhares de micro-organismos por centimetro cubico.

Parte d'esta agua penetra e lentamente vae atravessando o solo, atravez do qual se vae depurando pela fixação nos póros d'este, não só dos microbios, mas tambem da maior parte da materia organica que os acompanhava, e descendo sempre até encontrar uma camada impermeavel, fórma a camada subterranea, que alimenta os poços, e em certas condicções de terreno, origina as fontes, d'onde derivam os cursos d'agua.

O contheudo bacteriano das aguas d'este grupo é variavel; diminuto nos poços artesianos, cresce enormemente, frequentes vezes, nas fontes e

poços superficiaes, sujeitos como estão á inquinação pela atmosphaera e pelo terrend.

Outra parte vae directamente, sem atravessar camada nenhuma filtrante, reunir-se a esses cursos, que d'esse modo se encontram fortemente poluidos.

Immediatamente começa o trabalho de purificação, dependente de multiplas causas, a mais importante das quaes parece ser a sedimentação. Outro factor importante de auto-purificação é que muitas bacterias, adaptadas á vida sobre os animaes ou plantas, morrem; o que comtudo em parte é contrabalançado pela multiplicação d'aquellas especies que na agua facilmente se desenvolvem.

De tal modo, nas aguas que aproveitamos para bebida é certa a presença de microbios, sendo impossivel obter na natureza uma que d'elles seja inteiramente isenta, dependendo portanto o seu valor da *quantidade* e da *qualidade* da flora bacteriana.

II

Analyse quantitativa

Os processos de analyse bacteriologica quantitativa resumem-se em tomar uma quantidade determinada, convenientemente colhida, da agua a ensaiar, mistural-a com um meio nutritivo adequado, de modo que os micro-organismos n'ella existentes se multipliquem e formem colonias visiveis.

Ora, nem todos os micro-organismos que se encontram nas aguas (anaerobios, bacterias nitrificantes, etc.) se desenvolvem nos meios habituaes de cultura; além d'isso, pequenas modificações de composição d'esses meios causam consideraveis differenças de numero e crescimento das colonias; d'onde resulta que, pesquisando-se uma agua é ou não polluida, devemos sobretudo procurar collocar em boas condicções de desenvolvimento aquelles microbios que com essa polluição mais de perto

estão ligados—os do *sewage*; empregando meios invariavelmente preparados, afim de tornar comparáveis os resultados obtidos.

Obtém-se estes resultados empregando os meios aconselhados por Fuller, Whipple, e outros membros da comissão nomeada pela «American Public Health Association» para a unificação dos methodos de exame bacteriologico das aguas.

Quanto o emprego d'estes meios torna sensíveis as differenças entre aguas polluidas e não polluidas, prova-o o seguinte quadro extrahido de Gage and Phelps (citado em Prescott and Winslow, — *Elements of Water Bacteriology*).

*Percentagem de colonias que se desenvolvem
na gelose padrão e na gelose de Naehrstoff*

GELOSE PADRÃO

Origem da agua	Dias de contagem						
	2	3	4	5	6	7	8
Agua de fonte	0	5	6	6	6	6	6
Agua filtrada	6	7	7	7	7	7	7
Rio Merrimac	6	7	7	8	8	9	9
<i>Sewage</i> filtrado	14	17	18	19	19	19	19
<i>Sewage</i>	34	44	46	46	46	46	46

GELOSE DE NAEHRSTOFF

Agua de fonte	6	43	78	88	93	100	100
Agua filtrada	37	69	80	92	98	100	100
Rio Merrimac	29	78	93	97	97	99	100
<i>Sewage</i> filtrado	26	65	93	95	97	99	100
<i>Sewage</i>	39	75	95	100	100	100	100

Dependendo os resultados da analyse quantitativa do emprego d'uma technica cuidadosa, necessario é dizer, mesmo summariamente, quaes os seus processos, que se podem distribuir em quatro phases successivas.

COLHEITA.—Para a colheita da amostra empregam-se garrafas de vidro, fechadas com rôlha esme-

rilhada, de 100^{cc}, pelo menos, de capacidade, que antes de servir são cuidadosamente lavadas successivamente com permanganato de potassio, acido sulfurico e agua; depois de escoadas e secas são esterilizadas a 160° pelo calor secco durante uma hora, ou pelo vapor, no autoclave, a 120° durante trinta minutos. E' uma boa precaução antes de as collocar na estufa o envolver-lhes a rolha e o gargalo com uma camada d'algodão em rama que facilmente se fixa á volta d'este por meio d'um elastico.

Como sobre a pelle habita uma multidão de microbios,—entre os quaes, muitas vezes, o coli,— é necessario que na occasião da colheita os dedos não toquem a rolha, o que pela contaminação produzida falsearia os resultados.

Conforme vamos colher a agua a uma torneira, a um poço, a um charco ou a um rio, assim devemos modificar a maneira de proceder.

Assim, n'uma torneira, devemos deixar correr pelo menos durante cinco minutos a agua contida na canalisação, que pela morte d'algumas especies, e desenvolvimento d'outras, póde não representar a composição bacteriana habitual d'essa agua.

Se se trata d'uma agua de poço é necessario, antes de colher a amostra, fazer trabalhar a bomba durante meia hora, para evitar os numeros elevados devidos á pullulação que se dá na bomba e no poço. Demonstra bem a influencia d'esta maneira de proceder a seguinte observação de He-raeus: n'um poço de que pouca agua tinha sido

extrahida nas ultimas trinta e seis horas, a analyse revelava 5:000 bacterias por cc.; fazendo trabalhar a bomba até o esvasiar obteve, na agua colhida passada meia hora, sómente 35.

Mais difficil é obter uma boa amostra d'agua não corrente, quer pela possivel introduccão dos microbios dos dedos, quer pela d'aquelles que com as poeiras fluctuam á superficie.

E' costume n'este caso introduzir a garrafa fechada á profundidade de um palmo approximadamente, e só então tirar a rolha de modo que o ar seja substituido pela agua.

Se, porém, ha corrente, dirige-se a abertura da garrafa em sentido contrario de maneira que ella mesma desvie qualquer polluição que dos dedos possa provir.

Experiencias repetidas de Miquel, Frankland, Whipple, etc. demonstram que logo depois de colhida a amostra começa a dar-se uma alteração da sua composição bacteriana.

Estas alterações fazem-se sentir em todas as aguas; especialmente nas mais puras, a multiplicação das bacterias póde ser consideravel.

Miquel, estudando duas aguas, que na occasião da colheita continham uma 48, outra 71 bacterias por cc., encontrou ao fim de 24 horas de armazenagem respectivamente 38:000 e 71:000.

No caso citado por Frankland, uma agua que na occasião da colheita continha apenas 7 bacterias por cc. mostrou ao cabo de tres dias, 495:000.

As experiencias de Whipple demonstram

contudo que, se este crescimento é innegavel, não é immediato, mas precedido nas primeiras 6 horas d'uma diminuição dos micro-organismos.

Isto, para aguas mantidas á temperatura exterior. Se, porém, as envolvermos em gelo, de modo a mantel-as a uma temperatura visinha de 0° as amostras d'agua relativamente pura não soffrem alteração nas primeiras 12 horas.

Não succede o mesmo com aguas inquinadas, porque sendo os microbios do tubo intestinal, testemunhas d'essa polluição, muito sensiveis ás baixas temperaturas, morrem em grande numero, diminuindo assim consideravelmente os numeros obtidos na contagem. As seguintes observações de Jordan são demonstrativas.

Colhendo tres amostras de aguas de rio que continham, respectivamente: 535:000, 412:000 e 329:000 bacterias por cç. e conservando-as em gêlo, verificou ao fim de 48 horas apenas os seguintes numeros: 54:500, 50:500 e 73:000.

E', portanto, necessario tornar quanto possivel pequeno o intervallo entre a colheita e as operações subsequentes da analyse, e no caso de ser impossivel fazer a sementeira no proprio lugar da colheita, cingir-se á recommendação do «American Public Health Association Committee» que recommenda que esse intervallo não exceda 12 horas para aguas relativamnnte puras, 6 para as relativamente impuras e 1 hora no caso de *sewage*.

SEMENTEIRA.—Para esta operação tem-se previamente preparado: placas de Petri em numero conveniente, pipêtas graduadas e tubos de gelatina fundida a banho-maria a 30°

Agita-se fortemente a garrafa, para tornar o mais uniforme possível a distribuição das bacterias, toma-se um centimetro cubico de agua, que se colloca no centro d'uma placa, levantando a tampa d'esta apenas o necessario para a passagem da pipêta, e junta-se-lhe 5 cc. da gelatina.

Misturada a agua com a gelatina por meio de lentos movimentos de rotação, colloca-se a placa sobre o vidro bem nivellado que cobre um recipiente contendo gêlo, até completa solidificação da gelatina. Do mesmo modo se fazem mais 3 placas, de sorte que os numeros obtidos na contagem resultem, não do exame d'uma unica placa, mas da média de colonias desenvolvidas n'uma serie d'ellas.

Assim é quando se trata de aguas contendo até approximadamente 200 bacterias por cc.; porque, se este numero for maior, a contagem é difficil, senão impossivel, e tambem porque muitas d'ellas não se desenvolverão, impedidas no seu crescimento pelos productos da vida das que primeiro e mais fortemente formaram colonias. N'este caso é necessario previamente diluir a agua a examinar, o que se faz juntando 1 cc. d'ella a 9, 99, 999 cc. de agua de torneira esterilisada, e misturando bem por agitação.

Quando se analysar uma agua de composição

bacteriana desconhecida, será útil fazer mais do que uma serie de placas, com diluições diferentes, aproveitando para a contagem aquella que fornecer por placa numeros mais visinhos de 200, por ser essa a que mais approximadamente, por menos sujeita a erros, medirá o numero de microbios d'essa agua.

Para provar a influencia que, para o resultado da analyse, tem a escôlha das diluições, e portanto do numero de colonias desenvolvidas em cada placa, bastam os seguintes numeros:

Origem	N.º de colonias por cc. Diluição	
	20 cc. de agua a analysar; 80 cc. de agua esterilizada	1 cc. de agua a analysar; 99 cc. de agua esterilizada
Fonte de Cedofeita (7-XI-905)	20	1:000
Agua d'um poço (Villa-Verde). (14-I-906)	12	250
Agua do Souza.	141 (Media de 103 analyses. 27-II-99 a 26-VII-904)	2:242 (Media de 74 analyses. 5-VIII-904 a 26-II-906)

Em todas estas analyses, semeava-se 0,001 da diluição em cada placa.

A explicação da diversidade dos resultados obtidos com diluições diferentes está em parte no seguinte: para calcular o numero de colonias por c. c. é necessario, no caso da diluição de $\frac{20}{30}$, multiplicar a media do numero das colonias nas 4 placas por 25 ou $\left(\frac{50 \times 10}{20}\right)$ e por 1:000 quando a diluição for $\frac{1}{99}$.

Na diluição de $\frac{20}{30}$ uma colonia, em uma placa, representa, empregando quatro placas, na contagem por cc. 6,25 bacterias ($\frac{1}{4} \times 25$); na diluição $\frac{1}{99}$, nas mesmas condições, 250 bacterias, $\left(\frac{1}{4} \times 1:000\right)$.

Facilmente se comprehende, pois, como, pela intervenção d'estes factores, qualquer pequeno erro augmenta consideravelmente; e se, quando o numero de colonias derivadas dos microbios da agua for relativamente grande em cada placa, esses pequenos erros não alteram o resultado, não succede o mesmo quando as colonias forem poucas.

INCUBAÇÃO.—Depois de bem solidificada a gelatina, collocam-se as placas invertidas—para evitar a perda d'alguma d'ellas pelo alastramento rapido de colonias liquefacientes — na estufa saturada de humidade regulada a 20°.

Não é indifferente a duração do periodo de incubação, como o demonstram os quadros seguintes: o 1.º de resultados de analyses de aguas do

rio Douro; o 2.º extrahido de Miquel et Cambier.

QUADRO I

Origem	Duração da incubação		
	5 dias	10 dias	15 dias
Rio Douro — 3-5-906 . .	7250	11750	16750
» » . .	1250	3750	7250
» » . .	45250	64750	75000
» » . .	1750	5000	9000
» 10-5-906. .	9250	12250	17250
» » . .	5500	12500	25000
» » . .	3500	4500	5250
» » . .	9750	11250	13500
» 17-5-906. .	6750	20750	28500
» » . .	8250	17000	18250
» » . .	6500	14250	25000
» » . .	8000	16750	17750
» 25-5-906. .	12000	13250	14750
» » . .	11250	23000	33500
» » . .	10500	15250	16000
» » . .	28000	42000	51000
» 31-5-906. .	15500	17500	25000
» » . .	5750	21750	32250
» » . .	5500	14000	21000
» » . .	15250	32750	47500

QUADRO II

Influencia da duração da incubação das bacterias da agua em placas de gelatina, sobre o numero de colonias que se desenvolvem

Duração	N.º de colonias
1 dia	20
2 dias	136
3 »	254
4 »	387
5 »	530
6 »	637
7 »	725
8 »	780
9 »	821
10 »	859
11 »	892
12 »	921
13 »	951
14 »	976
15 »	1000

Que tempo deve, pois, durar a incubação?

Segundo Miquel et Cambier, e com elles estão os bacteriologistas francezes, essa duração não deve ser inferior a 15 dias.

Os allemães e norte-americanos procedem á contagem no fim de 48 horas, porque a maioria das bacterias que depois d'este tempo se desenvolvem pertencem a especies banaes da agua, sem

importancia para o reconhecimento da possível inquinação d'esta, ao passo que os microbios do *sewage* se desenvolvem quasi sem excepção dentro d'este periodo de tempo, o que fornece mais uma distincção entre boas e más aguas.

CONTAGEM.—Faz-se, determinando o numero de colonias que se desenvolveram na gelatina.

Fazendo mais do que uma serie de placas, convem escolher para esta operação aquella que apresenta uma media de 200 bacterias por placa, pois que, se este numero é muito maior, as colonias são pequenas, mal desenvolvidas, difficeis de contar, e muitas não se desenvolvem, abafadas pelo desenvolvimento das outras; se esse numero é muito mais pequeno, o que succede sempre que empregamos grandes diluições, os resultados podem ser muito falseados pela intervenção do factor da diluição.

Para evitar erros é costume collocar-se a placa sobre uma superficie dividida em pequenos quadrados, contando-se separadamente as colonias de cada um d'elles, á vista desarmada, ou em caso de duvida com o auxilio d'uma lupa.

Muito differentemente tem sido apreciado o valor da analyse quantitativa; emquanto uns observadores relacionam estreitamente o numero de microbios com a quantidade de materia organica existente na agua, affirmavam outros, funda-

dos em experiencias inatacaveis, que nenhuma relação se podia estabelecer entre a composição chimica e o conteúdo bacteriano.

A explicação d'esta discordancia deram-na Tieman e Gärtner.

As bacterias da agua aggrupam-se em duas classes. A das que, vivendo normalmente sobre o sólo, á custa de materias organicas em decomposição, necessitam de grande quantidade d'alimento; e a de certas fórmas particulares da agua, que mesmo em presença de diminutissimas quantidades de alimento, fartamente se multiplicam.

Em certos casos, como em poços e em nascentes de fontes, podem as d'esta ultima classe, em aguas puras, apresentar, por uma reproducção rapida, numeros elevados.

Outro tanto não succede em aguas de superficie, em que se não faz essa reproducção; dependendo, portanto, os numeros encontrados da quantidade de materia organica n'ellas introduzida, quer ella provenha da superficie do sólo, quer de *sewage*, elevando-se tanto mais esses numeros quanto maior fôr a poluição.

E' para a distincção entre estes dous grupos, que a redução a 48 horas do tempo de incubação das placas de gelatina, tem uma grande utilidade, porque é caracter commum ás do primeiro grupo desenvolverem-se muito lentamente, ao passo que as do segundo grupo, ao fim d'esse tempo, formam colonias bem visiveis.

O exame cuidadoso das placas fornece ainda

um outro caracter distinctivo; no caso em que os numeros elevados são devidos á multiplicação das bacterias banaes da agua, as colonias pertencem a um pequeno numero de especies, muitas vezes só a uma, o que não succede no caso de aguas inquinadas.

Alguns auctores procuraram estabelecer classificações de pureza d'agua baseadas unicamente no numero de bacterias.

Assim, Miquel propoz, e por muitos bacteriologistas foi accete tornando-se classica, a seguinte tabella:

	Bact. por cc.	
Agua excessivamente pura	0 a	10
» muito pura	10 a	100
» pura	100 a	1:000
» mediocre	1:000 a	10:000
» impura	10:000 a	100:000
» muito impura	mais de 100:000	

Macê fixa numeros inferiores a este, classificando do modo seguinte :

	Bact. por cc.	
Agua muito pura	0 a	20
» muito bôa	20 a	100
» bôa	100 a	200
» mediocre	200 a	500
» má	500 a	1:000
» muito má	1:000 a	10:000

Sternberg, no seu «Manual of Bacteriology» considera as aguas que contém menos de 100 bacterias por c.c. provavelmente livres de inquinação por drenagem superficial; suspeitas as que contiverem 500, e provavelmente inquinadas por drenagem superficial ou por *sewage* as que contiverem mais de 1:000.

A variedade dos numeros que cada auctor propõe para as suas classificações aliás estabelecidas arbitrariamente, prova a difficuldade de interpretação d'este genero d'analyse, e indica o cuidado que é necessario nas conclusões a tirar.

Sem fallar da possibilidade d'erros, que com um pouco de cautella faceis são de evitar, provenientes d'uma colheita mal feita, ou d'uma inquinação durante as operações da analyse, é preciso attender á origem da amostra, porque numeros que n'uma agua de fonte a tornam suspeita ou mesmo má, podem ser normaes para a d'um rio.

A analyse bacteriologica quantitativa encontra a sua mais cabal applicação na verificação da effi-
cacia dos filtros que atravessam as aguas destinadas á alimentação d'uma cidade. Um bom filtro reduz de 98 ou 99 0/0 o numero de bacterias, de modo que uma redução menor, ou, n'uma serie d'analyses, a elevação brusca do numero habitual, revela uma má installação, ou uma perturbação do funcionamento.

Os bacteriologistas americanos aconselham insistentemente o emprego da contagem das colônias que se desenvolvem a 37°.

Emquanto esta temperatura, optima para os microbios adaptados á vida sobre os animaes, lhes favorece o desenvolvimento, embaraça ou impede a multiplicação da maior parte das especies habitantes banaes do solo ou da agua; o que póde fornecer um elemento para julgar se determinada inquinação é ou não de origem fecal.

As operações são identicas ás da contagem a 20°, substituindo nas placas a gelatina por gelse, e contando ao fim de 24 horas, tempo sufficiente para o desenvolvimento.

Além d'isso sabendo-se que o colibacillo e os streptococcus do *sewage* têm a propriedade de decompor a dextrose e a lactose com formação de acidos, addiciona-se ao meio 2 0/0 d'este ultimo assucar e 1^o d'uma solução esterilizada de tornesol.

Examinando d'este modo aguas muito polluidas encontra-se um numero de colonias que eguala ou se approxima do que se obtem a 20° em gelatina, muitas das quaes avermelham o tornesol; com aguas não polluidas, pelo contrario, a relação entre as duas contagens baixa para $\frac{1}{10}$ ou $\frac{1}{12}$, e as colonias que avermelham o tornesol ou não apparecem ou apparecem em numero limitadissimo.

III

Analyse qualitativa

A principal accusação dirigida contra a analyse bacteriologica qualitativa era que, dando-nos a conhecer unicamente o numero de microbios existentes na agua, nada dizia sobre as especies a que pertenciam, sobre a sua pathogenicidade. Que importa—dizia-se—que uma agua contenha tantas mil bacterias, se ellas podem ser todas banaes? por outro lado, n'uma outra cuja composição bacteriana seja representada unicamente por unidades ou dezenas, não poderão esses numeros, total ou parcialmente, ser devidos á presença de especies pathogenicas?

Ch. Girard (*Revue d'hygiene* — 1884 e 1887) expressava-se assim: «La statistique des microbes, en général, ressemble á celle qui accuserait dans une forêt 1:000 animaux, sans spécifier leur espèce; que ce soient 1:000 lapins, cela ne nous inquiète guère; mais qu'il y ait sur le nombre un

seul lion, la question change de face. Les numérations de microbes ont pour nous la même valeur; tout est compté sans distinction d'espèce...

Aussi longtemps que les hygiénistes compteront des bactéries sans savoir si elles sont pathogènes ou non, je considérerai leurs travaux comme une statistique intéressante peut-être, encombrante à coup sûr (1).

Conhecidos os agentes etiologicos de febre typhoide e do cholera, e demonstrada a sua transmissibilidade pela agua, procurou-se surprehendêl-os n'ella e isolal-os.

Como estes agentes sempre se encontram em pequena quantidade na agua, os investigadores esforçaram-se por obter meios que, ao mesmo tempo que favorecessem o desenvolvimento d'estes, impedissem a proliferação dos microbios banaes que constantemente os acompanham.

No caso do bacillo d'Eberth varios processos foram aconselhados, procurando obter este resultado pela acção d'uma pequena porção d'acido e da temperatura de 37°.

No processo de Parietti emprega-se uma solução de acido chlorhydrico (a 4 0/0) e de phenol (a 5 0/0); tomam-se 9 tubos que se dividem em 3 series, de 3 cada uma, contendo 10^{cc} de caldo; junta-se, aos da 1.^a serie, 1^{cc} da agua a ensaiar, 2^{cc} aos de 2.^a e 3^{cc} aos da 3.^a; e aos tubos de cada

(1) Cit. em João Ferreira—*O bacillo d'Eberth. 1897. These do Porto.*

serie a solução de Parietti na proporção de III, VI e IX gottas, ao 1.º, 2.º e 3.º tubos, respectivamente.

Collocam-se os tubos na estufa a 37º, e ao fim de 24 horas examinam-se aquelles que turvaram; e d'aquelles que menos agua e mais acido continham, procura-se fazer o isolamento por meio de sementeira em placas de Petri.

No processo de Peré mistura-se 150^{cc} de caldo, 830^{cc} da agua a analysar e 20^{cc} d'uma solução de acido phenico a 5 0/0; depois de agitar bem, distribue-se em dez balões de 100^{cc} de capacidade e colloca-se na estufa a 37º. D'aquelles que ao fim de 24 horas se mostram turvos fazem-se placas para isolamento.

Vincent aconselhou, para com mais certeza com o methodo precedente se evitar o desenvolvimento das especies banaes, a temperatura de 41º.

Ora, se as condicções fornecidas por estes meios são altamente favoraveis á multiplicação do bacillo d'Eberth, muito mais o são em relação ao coli, que em grande numero sempre acompanha aquelle, d'onde resulta que n'estes processos d'enriquecimento os germens especificos podem, embora presentes, ser encobertos pelo coli.

Procurou-se então isolal-o directamente da agua, sem enriquecimento previo, semeando-a em placas de gelatina d'Elsner (infusão de batata com 10 0/0 de gelatina e 1 0/0 de iodeto de potassio).

As experiencias de Laws e Andrews, que não poderam isolar o bacillo d'Eberth do *sewage* de

Londres, e que n'uma longa serie de placas feitas com *sewage* d'um hospital onde estavam internados quarenta typhosos, só encontraram duas colonias d'esse bacillo, demonstram á evidencia as poucas probabilidades d'exitos que taes investigações devem ter na agua.

Reconhecida esta difficuldade, e provado por repetidas experiencias que na agua é muito restricta a vitalidade das bacterias pathogenicas, procurou-se resolver a questão indirectamente.

Se é o *sewage* que habitualmente vehicula para a agua esses germens pathogenicos, desde que se demonstre a existencia d'uma inquinação fecal, provada fica a *possibilidade* da existencia d'esses germens.

Ora, de todos os microbios das fezes o mais abundante é o coli, d'onde se concluiu, que toda a agua que o contiuesse era inquinada por materias fecaes, e portanto condemnada.

Não tardou, porém, a demonstrar-se que o B. coli existia, não só no intestino humano, mas no de muitos outros mammiferos, aves, peixes, etc., chegando mesmo alguns auctores, Kruse entre outros, a affirmar que elle não era uma fórma característica do tubo intestinal, mas um saprophyta largamente distribuido por toda a parte, no ar, no sólo, e na agua.

Abba e Moroni, estudando amostras de litro de aguas não polluidas de Turim e da sua visinhança, concluam que o B. coli era um microbio banal da agua, sem importancia sanitaria.

Weissenfeld, n'uma serie de 30 amostras d'aguas suppostas puras e 26 suppostas inquinadas, empregando 1^{cc} e em caso negativo 1/2 litro, affirmava que este microbio se podia isolar quer de boas, quer de más aguas, bastando para isso empregar quantidades sufficientes d'agua, negando por consequencia todo o valor sanitario a esta prova. E' necessario dizer que como *B. coli* classificava todos os bacillos de tamanho medio, mais ou menos moveis, ás vezes immoveis, que não tomavam o Gram, dando na gelatina colonias em fôlha de videira, e formando gazes na gelose asucarada, caracteres estes que são insufficientes para a identificação do microbio considerado.

Pouco a pouco, porém, vão-se tornando conhecidos factos e experiencias que inteiramente modificam o aspecto da questão.

Freudenreich (1895) verificando que em aguas puras o *B. coli* ou não existia, ou existia em pequena quantidade, sendo preciso empregar 100 ou mais c. c. para o isolar, ao passo que em aguas polluidas sempre se encontrava, e em tanto maior numero quanto maior fosse a polluição, indicava a necessidade de considerar o numero de colibacillos.

A pesquisa do coli sob o ponto de vista quantitativo tem sido fecunda em resultados praticos.

Houston, com o fim de verificar se as enxurradas podiam carrear para a agua microbios característicos do *sewage*, só em 10 de 46 analyses de

terras, encontrou o coli, e d'essas, 9 eram evidentemente polluidas por materias fecaes.

E concluia: «The relative abundance of *B. coli* in pure and impure substances is so amazingly different as to lead us to suspect that not only does *B. coli* not flourish in nature under ordinary conditions, but that it tends to even lose its vitality and die.»

Horrocks verificou que facilmente se isolava o *B. coli* de 1^{ca} de agua a que experimentalmente juntára *sewage* na proporção de $\frac{1}{100.000}$.

Com o fim de verificar a efficacia da filtração ou da purificação que naturalmente se dá nos rios polluidos, tem sido largamente estudado na America do Norte este assumpto.

Fuller encontrou 60 vezes o *B. coli* em 100 amostras de 1^{ca} d'agua do Ohio; depois de filtrada, só o encontrou em 50 $\frac{0}{0}$ das amostras de 50^{ca}.

No Merrimac, junto a Lawrence, a media de colis durante o anno de 1898 era de 47 por c. c.; de 117 amostras d'esta agua, depois de filtrada, só 9 continham 1 bacillo por c. c. Durante o anno seguinte a media de colis no rio foi a mesma, á sahida do filtro só 24 $\frac{0}{0}$ das amostras de 1^{ca} o continham e a percentagem baixava para 4 $\frac{0}{0}$ quando era examinada a agua que, depois de permanecer algum tempo n'um reservatorio, era colhida nas torneiras de distribuição.

Jordan, estudando a auto-purificação dos rios Desplaines e Illinois, depois de receberem o *sewage* de Chicago, encontrava o *B. coli* em 33 $\frac{0}{0}$

das amostras de $0,^{00} 00001$ de *sewage* recente, e quasi constantemente nas de $0,^{00} 0001$; no Illinois sete vezes em vinte e oito, em $0,^{00} 00001$, vinte e oito vezes em trinta e duas, em $0,^{00} 0001$. Vinte e sete milhas abaixo só obtinha resultados positivos, onze vezes em vinte, em $0,^{00} 0001$, vinte vezes em trinta, em $0,^{00} 01$, e vinte vezes em trinta e trez, em $0,^{00} 1$. Em Averyville, cento e cinquenta e nove milhas abaixo de Chicago, o *B. coli* só era isolado 4 vezes em vinte sete em $0,^{00} 1$, e trinta vezes em trinta e uma em 1^{00} .

Petruschky e Pusch, procurando resolver o problema—até que ponto a presença do *B. coli* pôde ser applicada como indicador da inquinação da agua por materias fecaes—tiram das suas numerosas investigações as conclusões seguintes:

«I—A ubiquidade do *B. coli* não pôde de modo algum ser confirmada. Repetidamente fizemos analyses d'agua nas quaes não existia nenhum *B. coli* na quantidade d'agua de que dispunhamos.

II—Em algumas aguas puras de fonte, não se encontra o *B. coli* mesmo em porções de $\frac{3}{4}$ de litro, e em aguas pouco polluidas em 100, 10 e talvez 1^{00} .

III—Em aguas fortemente polluidas, especialmente aguas de rio, foi o *coli* sempre encontrado; por meio da determinação quantitativa do *coli*, pôde obter-se uma boa medida da inquinação fecal da agua.

IV—As diferenças encontradas na extensão de poluição pelo coli nas aguas superficiaes eram tão grandes, que differiam umas das outras mais do que um milhão de vezes . . . »

Mais modernamente Vincent, retomando a questão, estabelece—«que o B. coli não existe em todas as aguas,» — «que é o intestino o *habitat* natural do bacillo d'Escherich» — e que «a quantidade de coli-bacillos contidos n'uma agua está em relação com a natureza da poluição», «devendo a analyse bacteriologica preoccupar-se menos da presença pura e simples do B. coli, do que da maior ou menor abundancia d'este microbio na agua». (1)

Estabelecido, pois, que é o *sewage* que mais facil e abundantemente póde introduzir na agua quantidades elevadas de coli-bacillos, a investigação do coli, sob o ponto de vista quantitativo, adquire um grande valor.

Varios processos tem sido aconselhados com este fim.

No de Proskauer e Elsner procura-se contar directamente os colis, semeando a agua em placas de Petri contendo gelatina d'Elsner.

Sem fallar da difficuldade de por este processo distribuir nas placas quantidades d'agua superiores a 1.^{cc} (por ex. 100^{cc} em 100 placas), que

(1) Sur la signification du «*Bacillus coli*» dans les eaux potables. H. Vincent—(*Annales de l'Institut Pasteur*—Avril 1905).

tempo se gastaria em identificar todas as colonias que, suspeitas de coli, germinassem nas placas?

No Laboratorio de Bacteriologia do Porto o methodo seguido é o de Petruschky, (1) levemente modificado.

D'elle me vou occupar mais minuciosamente.

* * *

O methodo baseia-se no facto, de que já fallei, de, quando se colloca na estufa a 37° agua addicionada de caldo, certas especies bacterianas, que por isso se chamam thermophilas, rapidamente pullularem, turvando o liquido, e abafando o desenvolvimento das especies banaes da agua.

Se ao fim de 24 horas o liquido se mostra uniformemente turvo, é certa a presença de especies thermophilas, das quaes as mais communs são: o B. coli, o B. faecalis alcaligenes, e o B. subtilis (mais raro) (2)

(1) Petruschky und Pusch. *Bacterium coli als indicator für Fäkalverunreinigung von Wässern. Zeitschrift für Hygiene*, 1903.

(2) Os auctores do methodo referem ter encontrado frequentes vezes um outro bacillo, que donominam *B. typhoides liquefaciens*, morphologica e biologicamente semelhante ao B. d'Eberth do qual se distingue comtudo, á parte a sero-reação, por liquefazer rapidamente a gelatina.

Este bacillo já foi encontrado na Foz, na fonte da Cantareira, em 1904.

De todos os microbios thermophilos, porém, o mais abundante em aguas inquinadas, é, com certeza, o.coli

Procede-se da maneira seguinte: se a agua, pela sua origem, é reputada pura, ou relativamente pura, tomam-se quatro balões contendo 100, 75, 50 e 25^{cc} e 3 tubos contendo 10^{cc} de caldo; aos balões junta-se, da agua a analysar, porções eguaes ás de caldo n'elles contido, e aos tubos d'ensaio 10, 1 e 0,1 cc.

Se suspeitarmos que a agua é fortemente inquinada põe-se de parte os balões, e semeiam-se pequenas quantidades d'agua apenas; para isso fazem-se as diluições seguintes:

Tendo previamente preparado 3 bálões com 99^{cc} de agua de torneira esterilisada, por meio de pipêtas, junta-se ao 1.º um centimetro cubico da agua a analysar; d'esta 1.^a diluição toma-se 1^{cc} que se adiciona ao 2.º, e d'este 1^{cc} ao 3.º. D'este modo se obteem as diluições $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{100.000}$ e $\frac{1}{1.000.000}$.

Aos tubos de caldo, que na occasião são convenientemente rotulados, junta-se depois

da agua não diluida.	1 ^{cc} e 0, ^{cc} 1
da 1. ^a diluição	1 ^{cc} e 0, ^{cc} 1
» 2. ^a »	1 ^{cc} e 0, ^{cc} 1
» 3. ^a »	1 ^{cc} e 0, ^{cc} 1

isto é, quantidades d'agua gradualmente decrescentes de 1^{cc} a 0,^{cc}000001.

Misturada a agua com o meio nutritivo, collo-

cam-se os tubos na estufa a 37° e observam-se ao fim de 24 horas.

Supponhamos que ao fim d'esse tempo turvou a serie de tubos desde 1^o até 0,001, ficando limpidos os restantes; a agua terá o titulo thermophilo 0,001.

E' nos tubos turvos que vamos procurar o coli, que em geral se encontra n'um dos dous tubos inferiores da serie; podemos já n'esta occasião obter uma forte presunção da presença do coli, adicionando 2 % de glucose ao caldo que serve para a determinação do titulo thermophilo; d'este modo, nos tubos que contiverem esta bacteria, a sua presença é indicada pela formação de gazes. Outro signal a aproveitar é o cheiro desagradavel, fecaloide, que os tubos que o contém espalham, quando se destapam.

Apartam-se, pois, os dous tubos inferiores da serie, e de cada um d'elles retira-se, por meio d'um *ase*, uma gotta que se dilue em 100^o de agua esterilizada; de cada uma d'estas diluições fazem-se, para isolamento, duas placas de gelose, uma com 0,001 e outra com uma gotta, que se examinam depois de 24 horas de permanencia na estufa a 37°.

Supponhamos que só encontramos o coli no tubo de 0,001; a agua terá o titulo coli-bacillar 0,01.

O methodo póde tornar-se muito mais rigoroso fazendo sementeira de quantidades intermedias. E' o que se costuma praticar no Laboratorio de

Bacteriologia do Porto, quando se analysa agua da Companhia. Sabendo-se que os titulos thermophilo e colibacillar d'esta agua oscillam entre 1^{cc} e $0,^{cc}1$, semeiam-se nos tubos as seguintes quantidades: $1,^{cc}0,^{cc}8$, $0,^{cc}6$, $0,^{cc}5$, $0,^{cc}4$, $0,^{cc}3$, $0,^{cc}2$, $0,^{cc}1$, $0,^{cc}01$ e $0,^{cc}001$.

O isolamento do coli póde ser altamente facilitado, adicionando, como aconselha Wurtz, á gelose, cuja reacção é alcalina, $2 \frac{0}{10}$ de lactose e 1^{cc} de uma solução neutra, esterilizada de tornesol. Visto que esta bacteria tem a propriedade de fermentar os assucares com formação d'um excesso d'acidos, procedendo d'este modo, as colonias de coli apparecem como pequenas gottas vermelhas n'um fundo azul.

Não é, comtudo, sómente o coli que produz esta apparencia nas placas; muitos outros microbios o podem fazer, de maneira que é necessario isolar em gelose e identificar as colonias suspeitas.

Póde considerar-se coli—um bacillo curto, muitas vezes quasi um coccus, pouco movel umas vezes, immovel outras, dando nas placas de agar de Wurtz colonias vermelhas, espêssas de contorno regular; e nas estrias em gelose uma massa branca, espêssa, bastante caracteristica; que fermenta a glucose e a lactose com formação de gazes; que dá na batata um crescimento rapido, espêssos, castanho avermelhado; que coagula o leite; que avermelha o sôro de leite tornesolado; que não liquefaz a gelatina; que reduz os nitratos; que forma indol no sôro physiologico peptonado; e tor-

na amarello canario com fluorescencia verde os meios, gelose ou caldo, contendo glucose e vermelho neutro.

Succede, porém, que determinados organismos isolados tenham perdido uma ou mais d'estas propriedades; assim uns fermentam pouco energeticamente os assucares; outros não reduzem os nitratos; outros não formam indol; outros ainda, não coagulam o leite; essas formas atypicas incluem-se no grupo dos para-colibacillos.

Cada auctor aconselha um certo numero de reacções, considerando verdadeiros colis, só áquelles bacillos que fornecem resultados positivos em todas ellas, e para-colis, aquelles a que faltam uma ou duas.

D'este modo a classificação é um pouco arbitraria, o que não tem na pratica grande importancia, desde que se demonstre que organismos definidos como colis por uma dada serie de reacções existem em aguas reconhecidamente polluidas, e não se encontram em aguas puras.

No Laboratorio de Bacteriologia do Porto a identificação do coli, faz-se pela seguinte maneira:

Nas placas de gelose lactosada tornesolada, que serviram para isolamento das especies existentes nos tubos em que se determinou o titulo thermophilo, escolhem-se aquellas colonias que pelo seu aspecto fazem suppôr serem de coli; e d'ellas, retirando-as cautelosamente com a ponta da faca, fazem-se culturas em estria em gelose ordinaria.

Ao fim de 24 horas de permanencia na estufa a 37° examinam-se as culturas obtidas; e se o seu aspecto macroscopico e microscopico corresponde ao do coli fazem-se com ella sementeiras em tubos de fermentação contendo caldo glucosado e lactosado; em leite, em gelose lactosada tornesolada, em gelose ou sôro physiologico lactosado com vermelho neutro, em sôro physiologico peptonado, em gelatina (picada) e em batata (estrias).

Ao fim de 24 horas examinam-se as tres primeiras culturas; se nos tubos de fermentação os gazes enchem de um a dous terços do ramo fechado, se o leite aquecido sobre a chamma do bico de Bunzen coagula, e se a gelose tornesolada, azul na occasião da sementeira, avermelhou, os resultados são considerados positivos e notados nos boletins.

Ao fim de 48 horas examinam-se as culturas em batata, e as dos meios que contém vermelho neutro; e serão consideradas reacções positivas, na batata o apparecimento ao longo da estria d'uma massa espessa, acastanhada, côr que tambem toma toda a batata; nos meios contendo vermelho neutro, a mudança de côr para amarello canario com fluorescencia verde.

Estas duas reacções nem sempre são apparentes ao fim de 48 horas; n'este caso tornam-se a collocar na estufa e examinam-se 24 horas depois juntamente com a agua peptonada. A este tubo, depois de arrefecido, junta-se successivamente 1 c. c. d'uma solução a 0,02 $\frac{0}{0}$ de nitrito de sodio ou

potassio e 1 c. c. de acido sulfurico diluido (partes eguaes de acido sulfurico puro e agua); deixa-se em sitio fresco e uma hora depois verifica-se se o liquido tomou a côr rosada ou vermelha caracteristica do indol; muitas vezes a côr apparece logo ou poucos minutos depois de se juntar o acido sulfurico.

O tubo de gelatina é conservado na estufa a 20° durante 7 dias e se ao cabo d'esse tempo a gelatina não está liquefeita, a reacção é considerada positiva.

* * *

A technica seguida em França para a determinação quantitativa do coli é um pouco differente.

Alb. Gautié, H. Vincent e Dienert (Annales de l'Institut Pasteur, février, avril et septembre, 1905) reconhecendo a necessidade d'essa determinação aconselham o uso de meios phenicados, segundo o methodo de Peré, para o enriquecimento previo da amostra, ligando Vincent, seguindo n'isso os bacteriologistas inglezes, grande importancia á pesquisa dos microbios da putrefacção e á dos anaerobios.

Com o fim de confirmar o valor da presença do coli como testemunha da inquinação fecal, procuraram alguns bacteriologistas determinar na

agua outros microbios, como elle habitantes do tubo intestinal; n'este sentido investigaram principalmente os estreptococcus do *sewage* e os anaerobios esporulados.

Comtudo, se, encontrados nas placas, organismos que a estes e a outros grupos pertençam (Proteus, B. subtilis, B. aerogenes, B. cloacae, que egualmente se encontram no *sewage*) merecem ser tomados em consideração e consignados na analyse, por não terem uma significação tão precisa como o coli, é desnecessario fazer investigações directas sobre elles.

* * *

Uma das qualidades que mais recommenda o methodo de Petruschky é a consideravel economia de tempo a dispender, quando se tenha de fazer uma serie grande de analyses; das numerosas observações concluiu elle que em aguas fortemente inquinadas o titulo thermophilo geralmente coincide com o titulo coli.

Por isso, quando rapidamente quizermos investigar a qualidade de uma agua, a simples determinação do titulo thermophilo fornece uma valiosissima informação, podendo considerar-se livre de inquinação aquellas que não turvarem o caldo ou cujo titulo thermophilo fôr muito baixo, sendo

dispensavel continuar a analyse; se, pelo contrario, o *T. thermophilo* fôr elevado, é conveniente prolongal-a até á determinação quantitativa do coli.

Os bacteriologistas norte-americanos usam um processo semelhantemente rapido, a que já anteriormente me referi, que denominam prova presumptiva (*presumptive test*); ao caldo juntam 2 0/0 de glucose e a incubação é feita em tubos de fermentação; se, no ramo fechado d'estes, ao fim de 24 horas apparecem gazes que encham 25 a 75 0/0 da sua capacidade, a presença de coli é certa e a prova considerada positiva; se os gazes só encham de 10 a 25 0/0 do tubo, a reacção é considerada positiva, mas atypica, e negativa se a quantidade de gazes é inferior a 10 0/0.

Demonstrado, pois, que na agua a presença do coli, habitante normal do intestino do homem e dos animaes significa, quando em quantidades elevadas, uma inquinação fecal recente, a sua pesquisa adquire um valor d'informação preciosa, quanto á qualidade sanitaria d'uma agua de bebida.

Comtudo, se numeros elevados são prova evidente de inquinação recente, e se pelo contrario a sua ausencia, ou a sua presença apenas em volumes grandes, (100^{cc} ou mais) não tem significação sanitaria especial, torna-se mais difficil estabelecer o valor d'aguas de titulo colibacillar medio.

Whipple, baseado n'um grande numero de analyses d'aguas, differentes no ponto de vista sani-

tario, desde aguas de nascentes situadas em lugares deshabitados, e portanto provavelmente puras, até aguas reconhecidamente polluidas, propoz a classificação seguinte, geralmente admittida pelos bacteriologistas norte-americanos :

	Titulo coli				
	0,01cc	0,1cc	1cc	10cc	100cc
Agua pura	o	o	o	o	+
» rasoavelmente pura	o	o	o	+	+
» suspeita	o	o	+	+	+
» provav. ^{te} inquinada	o	+	+	+	+
Agua inquinada	+	+	+	+	+

Conjugando o *T. thermophilo* com *T. coli*, J. da Camara Pestana (1) adopta os seguintes limites:

	<i>T. coli</i>	<i>T. thermophilo</i>
Agua muito pura. . .	o	o
» potavel.	1	0,1
» suspeita	0,1	0,1
» má	<0,1	<0,1

(1) Polytechnia—n.º 2—1905—Aguas potaveis sob o ponto de vista hygienico.

E' nos casos duvidosos que a analyse chimica, aliás sempre para desejar, póde decidir da classificação a dar á agua.

Na analyse chimica a interpretação deve basear-se sobretudo nas cifras de Az ammoniacal e nitroso, e no de materia organica, porque estès compostos, facil e rapidamente transformaveis, claramente indicam uma polluição recente; pelo contrario, os nitratos, termo final da oxydação do Az, e os chloretos, não têm uma significação tão precisa, visto que taes compostos podem egualmente existir n'uma agua recentemente inquinada, e n'uma outra já naturalmente purificada.

Os resultados da analyse bacteriologica têm maior precisão; se n'uma agua é impossivel, embora se semeiem algumas centenas de centímetros cubicos, isolar o coli, ou se tem um titulo colibacillar muito baixo, coincidindo este facto com cifras diminutas na analyse quantitativa, nenhuma duvida póde haver da sua inocuidade, e esta certeza não a póde dar a analyse chimica.

De resto, desde que o que nós pretendemos evitar na agua de bebida é a presença de bacterias pathogenicas, principalmente das provenientes do tubo intestinal, evidentemente a presença d'outras não pathogenicas da mesma origem está em muito mais estreitas relações com aquellas do que qualquer composto chimico.

Na seguinte tabella apresento os resultados obtidos pelos dois methodos, n'um pequeno numero d'amostras d'aguas de differentes origens.

As determinações da analyse chimica foram effectuadas pelos processos seguintes :

Resíduo fixo a 100°. — Obtido por evaporação de quantidade conhecida d'agua em capsula de platina, seccando o residuo na estufa a 100°, e pesando depois de arrefecido no exsiccador.

Residuo calcinado ao rubro. — O residuo da operação anterior é levado ao rubro sombrio, até calcinação completa. Pesa-se depois de arrefecido.

Perda por calcinação. — Determinada pela diferença entre as duas operações anteriores.

Oxydabilidade. — Determinada em soluto acido, pelo permanganato de potassio, segundo o methodo de Kubel.

Grau hydrotimetrico. — (Em graus francezes). Medido pelo soluto de sabão.

Az ammoniacal. — Pesquisado pelo reagente de Nessler e doseado pelo methodo colorimetrico (Frankland e Armstrong) por meio do mesmo reagente.

Az nitroso. — Pesquisado pelo acido sulfurico e pela metaphenilenadiazina, segundo o methodo de Griess.

Az nitrico. — Doseado pelo processo colorimetrico de Granval-Lajoux, baseado na transformação do acido nitrico em trinitrophenato d'ammonia, em presença do acido sulfophenico e da ammonia.

Chloretos. — Pelo processo volumetrico de Mohr.

Sulfatos. — Doseados, pesando o sulfato de baryo obtido precipitando o acido sulfurico pelo chloreto de baryo em presença d'um pequeno excesso de acido chlorhydrico.

Cal. — Determinada, pesando a cal anhydra obtida pela calcinação do oxalato de calcio precipitado pela addição de ammonia e oxalato d'ammonia.

ORIGEM	Resíduo a 100° (mgr. %/100)	Resíduo ao rubro calcinado (mgr. %/100)	Perda por calcinação (mgr. %/100)	Gr. hidrotimetrico (graus francezes)	Oxydabilidade (em mgr. de O)	Az amoniacal (em mgr. de Az H ³)	Az nitroso	Az nítrico (em K Az O ³)	Chloratos (em Na Cl)	Sulfatos (em SO ³)	Cal (em CaO)	Bacterias (por c. c.)	Título thermophilo	Título coli
N.º 1—Torreia do Lab. de Bact. da Esc. Medica (1)	71,6	53,6	18,	1,7	1,84	0	0	Vest.	35,1	11,8	7,4	2750	0,2	0,5
N.º 2—Marco fontenario da P. das Flores (1)	66,4	52,	14,4	1,8	2,	Vest.	0	»	35,1	11,9	7,3	1500	0,1	0,1
N.º 3—Marco font. da R. de Montebello (1)	60,4	46,	14,4	1,7	1,4	Vest. lev. msc	0	»	35,1	11,8	7,4	3500	0,5	1,
N.º 4—Torreia do Posto anti-diphtherico (1)	131,6	108,	23,6	1,8	2,5	»	0	»	35,1	11,8	—	2750	0,5	1,
N.º 5—Marco font. da P. Marquez de Pombal (1)	57,2	33,6	23,6	1,9	2,5	»	0	»	35,1	11,8	—	2500	0,1	1,
N.º 6—Marco font. da R. de S. Braz (1)	70,8	46,	24,8	1,9	2,3	»	0	»	35,1	11,8	—	2500	0,5	1,
N.º 7—Marco font. da R. da Constituição (1)	113,2	87,2	26,0	1,9	1,5	»	0	»	35,1	11,8	—	2750	0,5	1,
N.º 8—Manancial da Arca d'Agua	381,2	229,6	152,0	9,	2,6	0	0	84	181,3	14,9	49,	750	Neg. a 10cc	—
N.º 9—Fonte do Matadouro	479,2	263,2	216,0	9,3	2,1	0	0	84	181,3	20,5	49,	1000	10,	Neg. a 10cc
N.º 10—Fonte da Boavista	355,6	234,4	121,	9,7	2,8	0	0	84	187,2	15,4	48,	3000	0,01	0,1
N.º 11—Manancial da Arca d'Agua	384,8	230,8	154,	9,	2,5	0	0	80	181,3	16,3	48,	—	Neg. a 100cc	—
N.º 12—Manancial de Salgueiros.	982,8	651,6	331,2	15,4	3,1	Vest.	0	120	427,	135,6	120,	5750	0,1	1,
N.º 13—Fonte da R. das Oliveiras.	1018,8	712,4	298,4	15,9	3,4	»	0	120	450,5	156,5	127,	4000	0,1	0,5
N.º 14—Marco font. da Praça de Carlos Alberto	1181,6	765,6	416,	14,5	3,9	»	Vest.	110	421,2	138,6	110,5	4500	0,1	0,1
N.º 15—Marco font. da Praça de Santa Thereza.	353,2	174,0	179,2	8,1	2,2	»	0	82	181,3	15,1	48,	3500	0,1	0,5
N.º 16—Fonte de Cedofeita	319,2	193,6	125,6	9,3	1,3	»	0	70	152,1	14,2	52,	1000	25,	25,
N.º 17—Fonte dos Ferros Velhos.	346,0	219,2	126,8	9,1	1,1	»	0	70	152,1	16,9	50,4	—	50,	75,
N.º 18—Fonte da Cadeia.	494,	348,4	145,6	12,8	1,4	»	0	70	216,4	40,8	79,2	—	7,	15,
N.º 19—Fonte das Taypas.	486,8	326,8	160,	12,8	1,4	»	0	70	228,1	43,7	70,	5 (2)	0,05	0,05
N.º 20—Fonte do Largo de S. Domingos	545,2	345,6	199,6	14,	1,8	»	0	70	239,8	53,8	54,	312 (3)	0,5	0,5
N.º 21—Ponte da rua do Mousinho da Silveira (bica de baixo)	558,8	358,8	200,	15,9	1,6	»	0	70	251,5	54,9	53,6	31 (3)	3,	—
N.º 22—Fonte do Mercado de Ferreira Borges.	528,4	344,4	184,	—	3,5	2,12	0	70	245,7	53,0	54,4	8200 (3)	0,001	0,01
N.º 23—Fonte da Ribeira	520,8	362,4	158,4	—	2,3	2,	0	70	251,5	53,7	56,8	7175 (3)	0,001	0,001
N.º 24—Fonte de Miragaya	557,6	374,4	183,2	—	1,2	0	0	90	239,8	49,	60,	1500	0,2	0,5
N.º 25—Fonte da R. Commercio do Porto	554,4	358,4	196,	—	1,3	0	0	90	239,8	50,4	57,	—	0,1	0,1

(1) Agua da Companhia.

(2) Sem diluição.

(3) Diluição a 20/100.

APPENDICE

Sendo necessario, para poder obter resultados comparaveis, empregar meios sempre identicos, visto que pequenos desvios de composição e mesmo de preparação podem influenciar enormemente o desenvolvimento das bacterias, indico os processos de preparação d'alguns meios taes como são aconselhados pela «American Public Health Association».

Gelatina padrão

(Standard gelatin)

1

2—Infundir 500 gr. de carne limpa durante 24 horas em 1000 c. d'agua destillada.

3—Compensar o peso perdido por evaporação.

4—Filtrar a infusão atravez de flanella.

5—Pesar o filtrado.

6—Juntar 1 % de peptona de Witte e 10 % de gelatina em folhas (marca dourada).

Gelose padrão

(Standard agar)

1—Ferver 15 gr. de gelose em fios em 500 gr. d'agua durante meia hora; refazer o peso de 500 gr.

Deixar arrefecer até cerca de 60° C.

2—Infundir 500 gr. de carne limpa em 500 gr. de agua destillada, durante 24 horas.

6—Juntar 2 % de peptona de Witte.

7—Aquecer a ban' o-maria, mexendo sempre até dissolver a peptona e a gelatina, não deixando elevar a temperatura acima de 60° C.

8

9

8-Neutralizar.

9-A 500 gr. da infusão de carne juntar 500 cc. da gelse a 3 % mantendo a temperatura abaixo de 60° C.

10—Aquecer sobre agua fervente durante 30 minutos.

11—Compensar o peso perdido por evaporação.

12—Titular, depois de ferver 1' para expulsar o gaz carbonico.

13—Ajustar a reacção a + 1 % pela addição, conforme fôr preciso, de acido chlorhydrico ou de soda.

14—Ferver sobre a chamma, durante 2 minutos, mexendo sempre.

15—Compensar o peso perdido por evaporação.

16—Filtrar' atravez de algodão e de flanela até o liquido passar claro.

17—Titular.

18—Distribuir em tubos.

19—Esterilisar durante 15 minutos no autoclave a 110°.

20—Guardar na geleira em atmosphaera humida.

Caldo peptonado

1—Infundir 1:000 gr. de carne limpa em 2:000 cc. de agua destillada, na geleira, durante 20 horas.

2—Compensar o peso perdido por evaporação.

3—Filtrar atravez de um panno.

4—Titular, registrando a reacção do filtrado.

5—Pesar a infusão.

6—Collocar a infusão a banho-maria, mantendo a temperatura inferior a 60° C.

7—Juntar 1 % de peptona de Witte.

8—Titular depois de dissolvida a peptona.

9—Neutralisar.

10—Aquecer sobre agua a ferver durante 30 minutos.

11—Reparar o peso perdido por evaporação.

12—Titular.

13—Ajustar a reacção ao ponto desejado (+ 1,5 %).

14—Ferver durante 5 minutos sobre a chamma, mexendo sempre.

- 15—Reparar a perda de peso por evaporação.
- 16—Filtrar através de algodão repetidas vezes até o líquido passar limpo.
- 16—Titular, para verificar se se mantém a reacção desejada.
- 18—Distribuir em tubos e esterilizar.

CONCLUSÕES

É indispensavel o conhecimento da origem da amostra d'agua a analysar, para poder interpretar os resultados obtidos.

A analyse bacteriologica póde por si só, em muitos casos, classificar sanitariamente uma agua.

A analyse chimica, comtudo sempre para de-sejar, não é sanitariamente tão directa como a bacteriologica.

Na analyse bacteriologica quantitativa é necessario usar meios de composição identica, sendo conveniente reduzir para 48 horas o periodo de incubação das placas.

Sendo muito difficil, com os actuaes processos de technica bacteriologica, isolar o bacillo d'Eberth, o exame bacteriologico deve visar o isola-

mento e identificação d'outras especies, como elle d'origem intestinal.

Deixando de parte outros microbios cuja significação não é tão precisa, tem a maior importancia a investigação do coli, sob o ponto de vista quantitativo.

O processo mais recommendavel para esta investigação é o de Petruschky, modificado segundo a pratica dos bacteriologistas norte-americanos pela addicção de glucose ao caldo que serve para a determinação do *T. thermophilo*.

Apesar de arbitraria, acceito a classificação de Whipple, de—aguas puras, as que teem um titulo coli equal a 100 ou menor;—relativamente puras, as de titulo coli equal a 10; suspeitas as de titulo coli equal a 1;—provavelmente inquinadas, as de titulo coli equal a 0,1; e—inquinadas as de titulo coli equal ou superior a 0,01.

Na agua da Companhia attribuo as cifras relativamente elevadas do *T. thermophilo* e do *T. coli* a uma filtração imperfeita.

PROPOSIÇÕES

- Anatomia** — Pela sua estructura, ao intestino grosso deve o homem os mais graves accidentes da sua existencia.
- Physiologia** — Os alimentos mais appetecidos são os mais facilmente digeridos.
- Pathologia geral** — Os modernos estudos sobre a febre paratyphoide fornecem notaveis argumentos á theoria Rodet-Roux sobre o proximo parentesco do coli e typhico.
- Anatomia pathologica** — No homem ha só uma especie de pneumonia, e essa é produzida pelo pneumococco.
- Pathologia externa** — No tratamento das inflamações agudas e das suppurações deve sempre tentar-se o methodo de Bier.
- Pathologia interna** — A acetonuria não mede a acetoneia.
- Therapeutica** — Os purgantes salinos são o melhor desinfectante intestinal.
- Medicina operatoria** — D'uma maneira geral, nas fracturas comminutivas prefiro a resecção á amputação.
- Hygiene** — Impõe-se uma remodelação completa do abastecimento d'agua da cidade.
- Partus** — A abertura do fundo de sacco posterior da vagina impõe-se nos casos de abscesso pelvico.
- Medicina legal** — Os progressos da cirurgia tem limitado e limitarão ainda o ambito de prognostico medico-legal.

Visto.

Pinho,

Presidente.

Póde imprimir-se.

Moraes Caldas,

Director.