

CETESB	ESTREPTOCOCOS FECAIS – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS Método de Ensaio	L5.205 DEZ/1984
--------	---	--------------------

## SUMÁRIO

	Páginas
INTRODUÇÃO.....	2
1. OBJETIVO.....	4
2. DEFINIÇÕES.....	4
3. APARELHAGEM.....	6
4. EXECUÇÃO DO ENSAIO.....	14
5. RESULTADOS.....	20
ANEXO A	
ANEXO B	

### INTRODUÇÃO

Devido à possibilidade de contaminação das águas por excretas de origem humana ou animal, as mesmas apresentam o risco de conterem organismos patogênicos, tornando-se, assim, um veículo na transmissão de doenças. Nesse sentido, em relação a águas destinadas a consumo humano, é de fundamental importância a avaliação de sua qualidade, para determinar seu grau de segurança do ponto de vista microbiológico. Para essa avaliação, são usualmente empregados microrganismos que atuam como indicadores de contaminação fecal, cuja presença na água indica o risco da presença de organismos patogênicos.

Os estreptococos fecais constituem um grupo de bactérias reconhecidas como indicadores de contaminação fecal desde o início deste século, porém sua utilização só se faz efetiva após 1950, com o desenvolvimento de meios de cultura contendo azida sódica. O habitat normal deste grupo de bactérias é o trato intestinal humano e de outros animais e estas bactérias normalmente não ocorrem em águas e solos de áreas não poluídas, sendo que as poucas incidências estão relacionadas diretamente a animais de vida selvagem ou à drenagem dos solos por enxurradas. Embora estas bactérias possam persistir por longos períodos em águas de irrigação com alto teor eletrolítico, geralmente não se multiplicam em águas poluídas, sendo, portanto, sua presença indicativa de contaminação fecal recente.

Este grupo de bactérias engloba várias espécies que apresentam diferentes graus de resistência às variações ambientais e origens fecais específicas. Assim, as espécies incluídas no sub-grupo dos enterococos apresentam maior resistência e são caracterizadas por sua capacidade de crescer em temperaturas de 10 a 45°C, pH de até 9,6 e em meios com altas concentrações de cloreto de sódio; além disto, conseguem sobreviver a temperaturas de 60°C durante 30 minutos. Por outro lado, as espécies Streptococcus bovis e Streptococcus equinus são mais sensíveis que qualquer outro grupo de bactérias indicadoras de poluição fecal, resistindo somente cerca de 24 horas na água. Em relação à origem fecal das bactérias deste grupo, algumas espécies têm sido relatadas como sendo exclusivas de fezes humanas, como é o caso de Streptococcus faecalis; em fezes de animais são predominantes as espécies Streptococcus bovis e Streptococcus equinus e, em relação a aves domésticas, suas fezes são caracterizadas pela presença de Streptococcus avium. Dentro do grupo dos estreptococos fecais, encontram-se também dois biotipos de limitada significação sanitária: S. faecalis variedade liquefaciens e uma variedade do S. faecalis com capacidade de hidrolizar o amido. Estes biotipos não são restritos ao intestino do homem e outros animais de sangue quente, podendo ocorrer associados à vegetação e a certos tipos de solos.

Embora a existência destes biotipos limite a utilização dos estreptococos fecais como indicador ideal de contaminação fecal, este grupo é de grande valor em estudos para investigação da origem da poluição fecal, seja através da diferenciação das espécies (através de sua caracterização bioquímica), seja através da utilização da relação entre a densidade de coliformes fecais e a de estreptococos fecais  $\left(\frac{CF}{EF}\right)$ . Em relação à caracterização das espécies, por

exemplo, a predominância de S.bovis e S.equinus é indicativa de contaminação fecal animal (não humana); nesse sentido, estudos efetuados têm demonstrado elevados números destas espécies associados à poluição envolvendo indústrias de processamento de carnes, de fabricação de produtos derivados do leite e drenagem de águas de pastagens em fazendas. Dado o limitado tempo de sobrevivência destas espécies na água, sua presença indica contaminação fecal muito recente. Em relação à utilização conjunta de coliformes fecais (CF) e estreptococos fecais (EF), estudos realizados demonstram que quando a relação entre a densidade destes dois grupos de indicadores ( $\frac{CF}{EF}$ ) é superior a 4,0, há indicações de que a contaminação fecal seja de origem humana (esgotos domésticos), ao passo que valores inferiores a 0,7 sugerem poluição fecal de origem não humana; dados entre esses valores usualmente indicam poluição mista (humana e não humana). Para a aplicação da relação CF/EF, alguns cuidados especiais devem ser tomados, visando a obtenção de dados significativos. Nesse sentido, é aconselhável a medida do pH da amostra de água, visto que as densidades de estreptococos fecais podem ser alteradas significativamente em valores de pH acima de 9,0 e abaixo de 4,0; além disto, as amostras devem ser colhidas o mais próximo possível da fonte de poluição. Pontos de amostragem, em relação aos quais o tempo de trânsito da fonte poluidora excede 24 horas, poderão fornecer resultados duvidosos. Não é aconselhável a aplicação desta relação quando a densidade de estreptococos fecais é inferior a 100/100 ml e, para águas marinhas e estuarinas, sua utilização pode ser de pouco valor para a diferenciação entre fontes humanas e não humanas de poluição fecal.

Estudos comparativos relativos à resistência de vários indicadores, patógenos e vírus a diferentes processos de tratamento de esgoto têm demonstrado que a remoção de estreptococos fecais é consideravelmente menor que a de coliformes fecais, sendo, deste modo, mais estritamente relacionada à sobrevivência de vírus; nesse sentido, este grupo de bactérias constitui um indicador cuja pesquisa é de interesse para avaliação desses processos de tratamento.

1. OBJETIVO

1.1. Esta Norma prescreve a Técnica dos Tubos Múltiplos, utilizada na determinação do número mais provável de estreptococos fecais para:

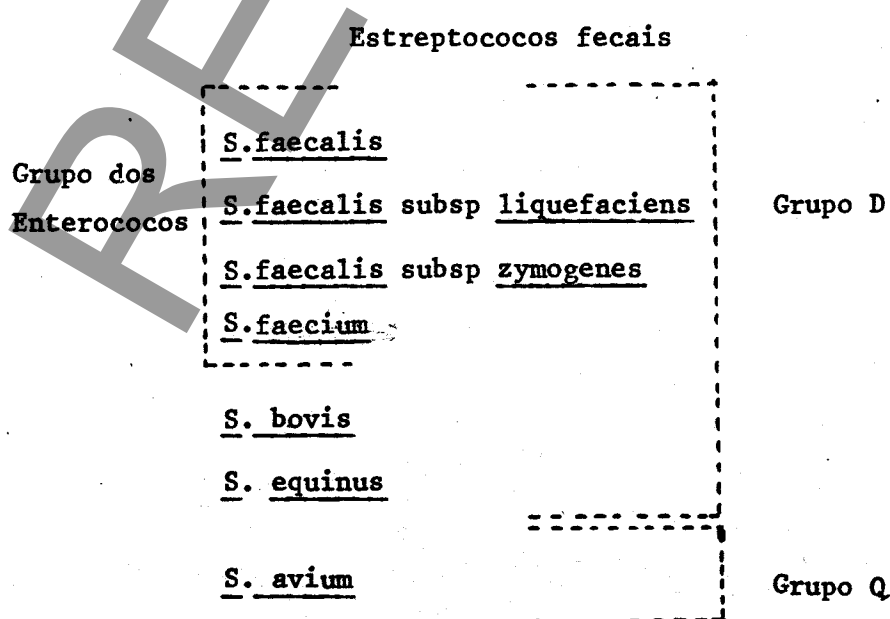
- . Avaliação da qualidade de águas de novas fontes de abastecimento.
- . Confirmação da origem fecal da contaminação, quando são obtidos resultados duvidosos no teste para coliformes em águas destinadas a consumo humano.
- . Avaliação da qualidade de águas subterrâneas.
- . Avaliação da qualidade de águas minerais.
- . Avaliação da qualidade de águas recreacionais.
- . Caracterização da origem fecal (humana ou animal), quando aplicada em conjunto com a determinação de coliformes fecais.

OBS: Este método não é recomendado para análise de águas marinhas.

2. DEFINIÇÕES

2.1. Estreptococos fecais

Este grupo engloba as espécies de estreptococos que ocorrem em grandes quantidades em fezes humanas e de outros animais, apresentando, assim, importância na avaliação da qualidade sanitária de águas e esgotos. Neste grupo são incluídos os grupos sorológicos D e Q, sendo as seguintes espécies e sub-grupos que o compõem:



Estas bactérias são cocos Gram-positivos, geralmente ocorrendo aos pares ou em cadeias curtas, apresentando reação negativa na prova de catalase. As características básicas empregadas para a confirmação de sua presença incluem sua capacidade de crescimento na presença de sais biliares e à temperatura de 45°C.

#### 2.2. N.M.P.

Número mais provável é a estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos mediante a aplicação da Técnica dos Tubos Múltiplos.

#### 2.3. C.D.A.

Caldo dextrose azida: meio de enriquecimento para estreptococos fecais, apresentando em sua composição azida sódica que atua como inibidor do crescimento de bactérias Gram-negativas.

#### 2.4. P.S.E.

"Pfizer Selective Enterococcus Agar": meio seletivo em que o crescimento de estreptococos fecais é evidenciado pela hidrólise da esculina presente no meio.

#### 2.5. Coco

Designação dada às bactérias que apresentam forma esférica.

#### 2.6. Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não de corante cristal-violeta.

#### 2.7. p.a.

Para análise

## 2.8. E.D.T.A.

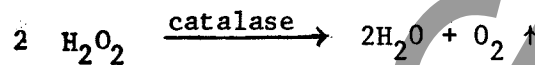
Ácido etilenodiaminotetracético.

## 2.9. q.s.p.

Quantidade suficiente para.

## 2.10. Catalase:

Enzima que cataliza a reação em que atuam duas moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma como doadora e outra como receptora de hidrogênio. Sua presença na bactéria, ao ser adicionado o peróxido de hidrogênio sobre uma suspensão da cultura, é evidenciada pela liberação de oxigênio ( $O_2$ ), havendo formação de bolhas de gás.



## 3. APARELHAGEM

### 3.1. Materiais e equipamentos

#### 3.1.1. Equipamentos de esterilização

##### 3.1.1.1. Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para colheita e toda a vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de  $170^{\circ}C - 180^{\circ}C$ . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, a  $170^{\circ}C - 180^{\circ}C$ .

##### 3.1.1.2. Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de se

gurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de  $121,6^{\circ}\text{C}$  ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de  $121^{\circ}\text{C}$  em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

### 3.1.2. Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a  $27^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3. Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao pesar 150 g.

### 3.1.4. Destilador de água ou aparelho para deionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana.

### 3.1.5. Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com exatidão e precisão de 0,1 unidades de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de  $\text{pH} = 4,0$ ,  $\text{pH} = 6,86$  e  $\text{pH} = 9,18$ .

### 3.1.6. Banho maria

Equipado com termostato para temperatura de aproximadamente 45-50°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meio de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes da distribuição em placas de Petri.

### 3.1.7. Frascos para colheita de amostras

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

### 3.1.8. Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter 90 + 2 ml de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

### 3.1.9. Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o volume necessário de meio de cultura e o inóculo da amostra. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e 16 mm x 150 mm.

### 3.1.10. Placas de Petri

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras e bolhas de ar, com 15 mm de altura x 100 mm de diâmetro.

### 3.1.11. Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 5 ml e 10 ml, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel. São esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante duas horas.

### 3.1.12. Materiais para preparação de meios de cultura

Recipientes de vidro ou aço inox. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

### 3.1.13. Bico de Bunsen ou similar

### 3.1.14. Tripé



3.1.15. Tela de amianto de 22 cm x 22 cm

3.1.16. Alças de inoculação

De platina, platina-irídio, ou níquel-cromo, com 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm; são colocadas em cabos de metal (cabo de Kolle).

3.1.17. Estantes

De arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e de 16 mm x 150 mm.

3.2. Reagentes

Para o preparo dos meios de cultura, dá-se preferência à utilização de meios desidratados de procedência idônea, visando maior uniformidade dos mesmos. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório, sendo que os reagentes a serem utilizados devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos e outros carboidratos fermentáveis que não os em teste, e fornecer os nutrientes necessários para os organismos pesquisados.

São os seguintes os reagentes necessários:

- . Agar
- . Azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) p.a.
- . Bile bacteriológica
- . Citrato férrico amoniacal p.a.
- . Citrato de sódio p.a.
- . Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.
- . Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) p.a.
- . Dextrose
- . E.D.T.A. (ácido etilenodiaminotetracético) p.a.
- . Esculina
- . Extrato de carne
- . Extrato de levedura

- . Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a.
- . Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) p.a.
- . Peptona
- . Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) p.a.
- . Triptona

3.2.1. Meios de cultura desidratados:

- . "Azide Dextrose Broth" (Caldo Dextrose Azida)

3.3. Meios de Cultura

3.3.1. Caldo Dextrose Azida de concentração simples

Fórmula:

Extrato de carne.....	4,5 g
Triptona ou Polipeptona.....	15,0 g
Dextrose.....	7,5 g
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) p.a.....	7,5 g
Azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) p.a.....	0,2 g
Água destilada.....	1000 ml
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$	

Preparo:

Pesar 34,7 g do meio desidratado "Azide Dextrose Broth" e acrescentar 1000 ml de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final após esterilização, seja de 10 ml. Tamponar os tubos e esterilizar por autoclavação a ~~121~~121°C durante 15 minutos

3.3.2. Caldo Dextrose Azida de concentração dupla

Fórmula:

Extrato de carne.....	9,0 g
Triptona ou Polipeptona.....	30,0 g
Dextrose.....	15,0 g

Cloreto de sódio (NaCl)p.a..... 15,0 g  
Azida sódica (NaN<sub>3</sub>)p.a..... 0,4 g  
Água destilada.....1000 ml  
pH final após esterilização: 7,2

Preparo:

Pesar 69,4g do meio desidratado "Azide Dextrose Broth" e acrescentar 1000 ml de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, distribuir volumes a dequados para que o volume final após esterilização, seja de 10 ml. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3.3. P.S.E. ("Pfizer Selective Enterococcus Agar")

Fórmula:

Triptona..... 17,0 g  
Peptona..... 3,0 g  
Extrato de levedura..... 5,0 g  
Bile bacteriológica..... 10,0 g  
Cloreto de sódio (NaCl)p.a..... 5,0 g  
Citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)p.a..... 1,0 g  
Esculina..... 1,0 g  
Citrato férrico amoniacal..... 0,5 g  
Azida sódica (NaN<sub>3</sub>)..... 0,25 g  
Agar..... 15,0 g  
Água destilada..... 1000 ml  
pH final após esterilização: 7,1 ± 0,2

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1000 ml de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após esterilização, estabilizar a temperatura do meio de cultura em banho-maria a 45-50°C, não ultrapassando 4 h entre a preparação

e a distribuição do meio. Distribuir volumes de, aproximadamente, 12 ml em placas de Petri de 15 mm x 100 mm.

### 3.4. Água de diluição

#### 3.4.1. Solução Estoque A

Fórmula:

Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a.....	34,0 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo:

Dissolver o fosfato monopotássico em 500 ml de água destilada, ajustar o pH para  $7,2 \pm 0,1$  com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro de água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

#### 3.4.2. Solução Estoque B

Fórmula:

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) p.a.....	81,1 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo:

Dissolver o cloreto de magnésio em um litro de água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso no laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira.

#### 3.4.3. Água de diluição

Fórmula:

Solução Estoque A.....	1,25 ml
Solução Estoque B.....	5,00 ml
Água destilada.....	1000 ml

pH final após esterilização:  $7,2 \pm 0,1$ .

**Preparo:**

Adicionar 1,25 ml da solução estoque A e 5 ml da solução estoque B a 1 litro de água destilada. Distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a 121°C durante 15 minutos, volumes de 90 + 2 ml.

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

**3.4.4. Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-LN).**

**Fórmula:**

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

**Preparo:**

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 ml com água destilada.

**3.4.5. Solução de E.D.T.A. a 15%**

**Fórmula:**

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)..... 150,0 g  
Água destilada.....1000 ml

**Preparo:**

Pesar 150 g de EDTA e dissolver em 1000 ml de água destilada. Ajustar o pH

para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para colheita de amostras de águas suspeitas de conterem metais pesados, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, volumes de 0,3 ml dessa solução para cada 100 ml da amostra a ser colhida.

OBS: Além da solução de EDTA, no volume especificado acima, devem ser adicionados aos frascos de colheita dessas amostras, volumes de 0,1 ml de uma solução de tiossulfato de sódio a 10% para cada 100 ml da amostra a ser colhida.

#### 3.4.6. Solução de Tiossulfato de sódio a 1,8%

Fórmula:

Tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) p.a.....	18,0 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo:

Pesar 18 g de tiossulfato de sódio e dissolver em 1000 ml de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para colheita de amostras de águas tratadas, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, volumes de 0,1 ml dessa solução para cada 100 ml da amostra a ser colhida.

## 4. EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 4.1. Princípio do método

4.1.1. A determinação do N.M.P. de estreptococos fecais em uma dada amostra é efetuada a partir de aplicação da Técnica de Tubos Múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas uma das outras por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas individuais, uniformemente distribuídas na amostra original e consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos cuja semeadura fornece resultados ne

gativos em pelo menos um tubo da última série em que os mesmos foram inoculados e a combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade original das bactérias pesquisadas (NMP), através da aplicação de cálculos de probabilidade. Para análises de água, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e sub-múltiplos de 1 ml da amostra, usando-se séries de 5 tubos para cada volume a ser inoculado. Para a determinação do NMP de estreptococos fecais em uma amostra, é requerida a confirmação dos resultados positivos obtidos no meio de cultura usado para inoculação da amostra.

4.1.2. O exame se processa através de 2 etapas: ensaios presuntivo e confirmativo.

4.1.2.1. Ensaio presuntivo:

Consiste na semeadura de volumes determinados da amostra em série de tubos contendo Caldo Dextrose Azida, que são incubados a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 24-48 horas. A turvação e/ou formação de precipitado no meio é resultado presuntivo positivo para estreptococos fecais neste ensaio.

4.1.2.2. Ensaio confirmativo:

Consiste na transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo (turvação e/ou formação de precipitado em Caldo Dextrose Azida) para placas de Petri contendo Agar P.S.E., sendo a incubação efetuada a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas. A presença de colônias com coloração castanho-enegrecida, com halo marrom (decorrente da hidrólise da esculina) constitui resultado positivo neste ensaio, confirmando a presença de estreptococos fecais.

4.2. Reações

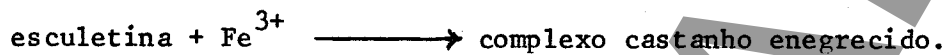
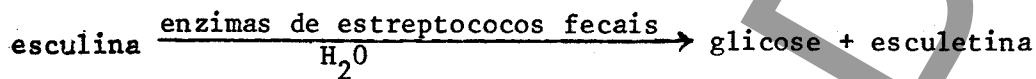
4.2.1. Em Caldo Dextrose Azida

O C.D.A. é um meio de cultura que contém os fatores nutrientes requeridos para a maioria das bactérias. A incorporação de azida sódica nesse meio inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas, devido à inibição do sistema citocromo bacteriano e redução da atividade da catalase. Os cocos Gram-positivos não são afetados por esse inibidor e crescem satisfatoriamente. Os estreptococos fecais se desenvolvem nesse meio, fermentando a

dextrose e sua presença é detectada pela turvação e/ou formação de precipitado no meio.

#### 4.2.2. Em Agar P.S.E.

Os estreptococos fecais, através de suas enzimas e na presença de água, hidrolizam a esculina contida no meio, havendo formação de esculetina (6,7 dihidroxicumarina) que reage com o ion fêrrico presente no meio, formando um complexo castanho enegrecido, difusível no meio.



#### 4.3. Amostragem e amostra

##### 4.3.1. Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Orientação para Colheita e Preservação de Amostras (CETESB).

##### 4.3.2. Amostra

4.3.2.1. Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

4.3.2.2. Agente neutralizador de cloro residual: Para a colheita de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,1 ml de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 ml da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de 5 mg/l de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nes



tes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 ml de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 ml da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/l de cloro residual.

4.3.2.3. Agentes quelantes: Para a colheita de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 mg/l de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,3 ml de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 ml da amostra, além do tiossulfato de sódio (volumes de 0,1 ml de uma solução a 10% para cada 100 ml da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de colheita separadamente ou já combinada com a solução de tiossulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiossulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

4.3.2.4. Transporte e conservação: Após a colheita, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e início do exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

#### 4.4. Procedimento

4.4.1. Preparar os tubos de C.D.A, exigidos para a prova e dispô-los em estante em fileiras de 5 tubos. Para as inoculações das porções de 10 ml da amostra, usar o C.D.A. em concentração dupla.

4.4.2. Proceder à marcação dos tubos, anotando o número designado pelo laboratório na ficha de registro de exames, o volume selecionado da amostra a ser inoculada e a data. Esta marcação poderá ser feita somente no 1º tubo à direita na 1ª fileira. Nos primeiros tubos das fileiras seguintes, pode-se simplificar a marcação, colocando apenas o volume da amostra a ser inoculado. Identificar, também, os frascos de água de diluição.

4.4.3. Homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de, aproximadamente, 45° entre o braço e antebraço.

4.4.4. Com uma pipeta esterilizada de 10 ml e obedecendo aos cuidados de as sepsia, transferir 10 ml da amostra para um frasco contendo  $90 \pm 2$  ml de água de diluição tamponada, antecipadamente identificado. Prepara-se, assim, a 1ª diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 ml da mesma corresponde a 0,1 ml da amostra.

4.4.5. Com a mesma pipeta, semear 10 ml da amostra em cada um dos tubos de C.D.A. de concentração dupla, quando este volume for requerido para o tes te.

4.4.6. Desprezar a pipeta de 10 ml e, com uma pipeta de 5 ml, inocular 1 ml da amostra em cada um dos 5 tubos correspondentes a essa quantidade de inô culo.

4.4.7. Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) como em 4.4.3. e, com uma nova pipeta esterilizada, transferir 10 ml para um fras co contendo  $90 \pm 2$  ml de água de diluição tamponada, conseguindo-se, assim, a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1 ml da mesma corresponde a 0,01 ml da amostra.

4.4.8. Proceder dessa maneira na sequência de diluições desejadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  .....  $10^{-8}$  .....).

4.4.9. Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo sequência decre cente das mesmas (da maior para a menor diluição efetuada).

4.4.10. Agitar vigorosamente, 25 vezes, o frasco com a última diluição efe tuada e, com uma pipeta estéril de 5 ml, semear 1 ml da diluição em cada um dos tubos de C.D.A. (concentração simples), correspondentes a essa dilui ção.

4.4.11. Proceder dessa maneira, semeando de trás para frente, sempre com a mesma pipeta, da maior para a menor diluição.

4.4.12. Após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o exame, colocar a estante contendo os tubos inoculados em incubadora a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante  $24 \pm 2$  horas.

4.4.13. Após esse período de incubação, retirar os tubos da incubadora para efetuar a primeira leitura dos resultados. Para isso agitar delicadamente ca da tubo, e examiná-lo quanto à turvação e/ou formação de precipitado no meio, que constituem resultado presuntivo positivo. Retirar os tubos com resultado positivo e anotar os resultados. Retornar à incubadora os tubos com resultado negativo, por um período adicional de 24 + 1 hora.

4.4.14. A segunda leitura (48 + 3 h) será feita nas mesmas condições, sendo que os tubos de C.D.A. com resultado positivo serão separados e os negativos serão agora desprezados.

4.4.15. Para a realização do ensaio confirmativo, todos os tubos com resultado positivo em C.D.A. nas leituras de 24 + 2 h e 48 + 3 h serão submetidos à confirmação imediatamente após as respectivas leituras.

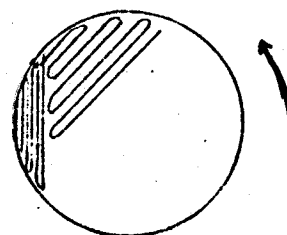
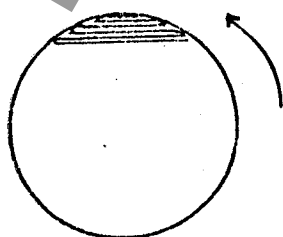
4.4.16. O ensaio confirmativo é efetuado utilizando-se o Agar P.S.E., sendo a seguinte a sequência do procedimento para execução desse ensaio:

4.4.16.1. Identificar placas de Agar P.S.E., correspondendo, cada uma, a um tubo de C.D.A. com resultado positivo no ensaio presuntivo.

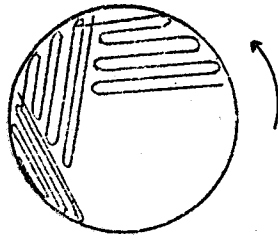
4.4.16.2. Flambar e resfriar uma alça de inoculação (fio de platina ou níquel cromo, com a parte final encurvada, formando um aro de diâmetro mínimo de 3 mm).

4.4.16.3. Agitar e inclinar o tubo de Caldo Dextrose Azida e, a seguir, mergulhar a extremidade da alça de inoculação, devidamente flambada e resfriada, no meio de cultura contido no tubo (a uma profundidade de aproximadamente 1 cm), para colher um inóculo da cultura.

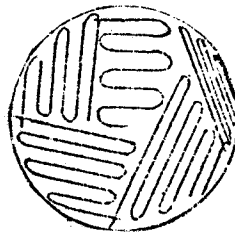
4.4.16.4. Depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de Agar P.S.E. girá-la e iniciar seu espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando ferir o agar.



4.4.16.5. Girar novamente a placa e continuar o espalhamento no 2º quadrante.



4.4.16.6. Proceder dessa maneira até completar a semeadura em toda superfície do agar.



4.4.16.7. Fechar e incubar a placa em posição invertida durante  $48 \pm 3$  h a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

4.4.16.8. Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura, considerando colônias típicas de estreptococos fecais as que apresentarem coloração castanho-enebecida, com halo marrom.

4.4.16.9. Verificar as placas correspondentes a cada tubo e anotar os resultados obtidos.

4.4.16.10. Com os dados obtidos, calcular o N.M.P. de estreptococos fecais.

## 5. RESULTADOS

5.1. A densidade de estreptococos fecais é expressa como N.M.P. de estreptococos fecais por 100 ml.

5.2. O N.M.P. de estreptococos fecais é obtido através de tabelas em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de N.M.P. determinado.

5.3. Tabela 1: Fornece o N.M.P. para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 5 porções de 10 ml da amostra.

TABELA 1

ÍNDICE DE N.M.P. E LIMITES DE CONFIANÇA DE 95% PARA VÁRIAS COMBINAÇÕES DE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS QUANDO SÃO UTILIZADAS 5 PORÇÕES DE 10 ml

Nº de Tubos que apresentam reação positiva, a partir de 5 tubos de 10 ml	Índice de N.M.P. por 100 ml	Limites de confiança de 95%	
		inferior	superior
0	<2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	Infinito

5.4. Tabela 2: Fornece o N.M.P. para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são inoculadas 5 porções de 10 ml, 5 porções de 1 ml e 5 porções de 0,1 ml da amostra. Embora os volumes indicados nesta tabela se refiram mais especificamente a amostras de água pouco poluídas, ela pode ser também utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados.

Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por 3 algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em 3 séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do N.M.P. de estreptococos feçais, o código é formado a partir dos resultados obtidos no ensaio confirmativo, considerando-se como número de tubos positivos para a composição do código, o número de tubos do Caldo Dextrose Azida inicialmente inoculados, cuja positividade dos resultados foi confirmada em Agar P.S.E.

TABELA 2

ÍNDICE DE N.M.P. E LIMITES DE CONFIANÇA DE 95% PARA VÁRIAS COMBINAÇÕES DE RESULTA DOS POSITIVOS E NEGATIVOS, QUANDO SÃO UTILIZADAS 5 PORÇÕES DE 10ml, 5 PORÇÕES DE 1 ml E 5 PORÇÕES DE 0,1 ml

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados: .			Índice de N.M.P. por 100 ml	Limites de Confiança 95 %	
5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml	5 tubos de 0,1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	< 2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	29
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	>1600	-	-

5.4.1. Utilização da tabela 2.

5.4.1.1. Quando são inoculadas apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados os volumes indicados na Tabela (10 ml, 1 ml e 0,1 ml):

Neste caso, o N.M.P. é obtido diretamente a partir da Tabela. Para isto, procura-se o código formado pelo nº de tubos com resultados positivos obtidos nas tres séries consecutivas inoculadas, verificando-se o N.M.P. correspondente. Considerem-se os seguintes exemplos, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados:

Exemplos	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com			Código (combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100 ml
	10 ml	1 ml	0,1 ml		
1	5	2	0	520	50
2	4	2	0	420	22
3	5	5	1	551	300
4	5	5	5	555	≥1600

5.4.1.2. Quando são inoculadas apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados outros volumes decimais que os indicados na tabela:

Neste caso, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivo obtidos nas tres séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor de N.M.P. correspondente a ele; o N.M.P./100 ml será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

Considerem-se os seguintes exemplos:

Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 ml
	100 ml	10 ml	1(10 <sup>0</sup> ) ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml				
100-10-1	5	4	0					540	130	$130 \times \frac{10}{100}$	13
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-2</sup>			5	0	0			500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-3</sup>				4	1	0		410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-4</sup>					3	0	0	300	8	$8 \times \frac{10}{0,01}$	8000

5.4.1.3. Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados:

Neste caso, para a composição do código, são utilizados apenas os resultados correspondentes a tres séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentarem resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os 3 algarismos para o código. Encontrando-se o código na tabela e o N.M.P. a ele correspondente, o valor final do N.M.P. será obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Valor de NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado, selecionado para compor o código}}$$

Exemplos

Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultado positivo em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 ml
	10 ml	1(10 <sup>0</sup> ) ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml				
10 a 10 <sup>-2</sup>	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>				531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1,1x10 <sup>3</sup>
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-4</sup>		5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0		521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7,0x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-5</sup>			5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	520	50	$50 \times \frac{10}{0,001}$	5,0x10 <sup>5</sup>
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-6</sup>				5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3x10 <sup>5</sup>

OBS: Números grifados correspondem ao nº de tubos selecionados para compor o código.



## Casos especiais

- a) Se menos que tres das diluições inoculadas apresentam resultados positivos, para a composição do código são selecionados os tres maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver exemplo 1 da tabela a seguir).
- b) Se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao nº de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver exemplo 2 da tabela a seguir).
- c) Embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores à aqueles selecionados para a formação do código, se isto ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultado positivo nos cinco tubos, seguido do nº de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver exemplo 3 da tabela a seguir).
- d) Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar para a composição do código as tres maiores diluições (ver exemplo 4 da tabela a seguir).
- e) Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar para a formação do código as tres menores diluições (ver exemplo 5 da tabela a seguir)

Exemplos	Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 ml
		10 <sup>0</sup> ml	1(10) <sup>0</sup> ml	-1 10 <sup>0</sup> ml	-2 10 <sup>0</sup> ml	-3 10 <sup>0</sup> ml	-4 10 <sup>0</sup> ml	-5 10 <sup>0</sup> ml				
1	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-3</sup>	4	1	0	0			410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	170	
2	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-5</sup>	5	5	4	1	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	$2,2 \times 10^4$	
3	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-4</sup>	4	5	4	0	0	0	540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	$1,3 \times 10^3$	
4	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-5</sup>			5	5	5	5	555	≥ 1600	$\geq 1600 \times \frac{10}{0,001}$	$\geq 1,6 \times 10^7$	
5	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-5</sup>			0	0	0	0	000	< 2	$< 2 \times \frac{10}{0,1}$	< 200	

## ANEXO A

### Prescrições Gerais

#### A.1. Considerações gerais sobre a aplicação de estreptococos fecais

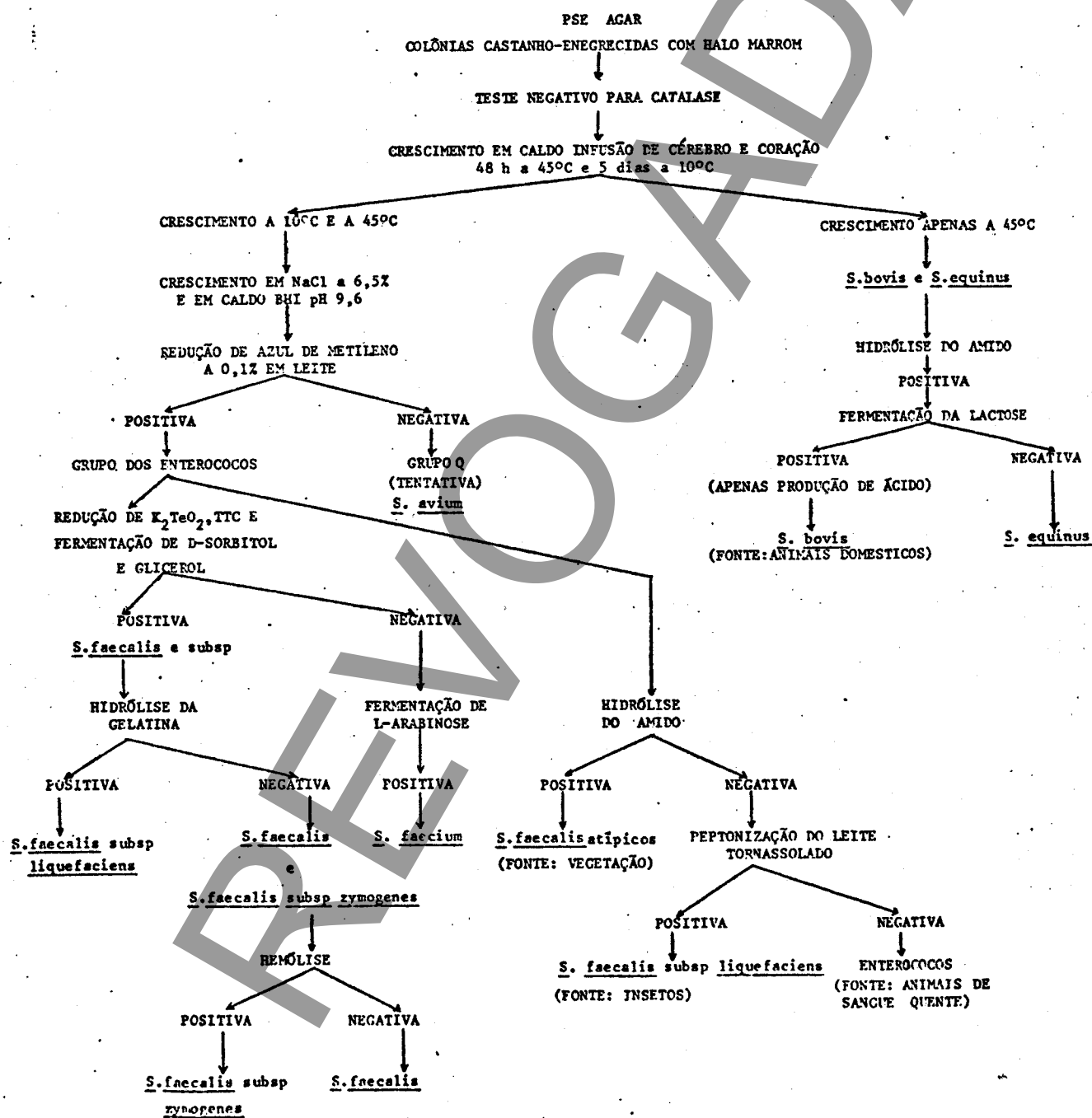
Embora a determinação de estreptococos fecais possa fornecer dados suplementares valiosos, não é recomendada sua utilização como único parâmetro bacteriológico na avaliação da qualidade da água. Em combinação com a determinação de coliformes fecais, os resultados relativos à densidade de estreptococos fecais podem fornecer informações mais específicas sobre a fonte de poluição. Sua pesquisa é de particular interesse na avaliação da qualidade de águas para consumo humano, águas de reservatórios e outros tipos de água em que a contaminação viral é indesejável. São aplicáveis também para a determinação da qualidade de águas com teores elevados de matéria orgânica, especialmente quando as mesmas recebem efluentes de esgotos clorados.

#### A.2. Streptococcus faecalis subsp liquefaciens

A existência deste biotipo de limitado significado sanitário restringe a utilização dos estreptococos fecais como indicador de contaminação fecal e atenção especial deve ser dada à interpretação dos resultados, particularmente quando baixas densidades de estreptococos fecais são obtidas em amostras de água, pois, quando as contagens são inferiores a 100 estreptococos fecais/100 ml, este biotipo é geralmente predominante. Em decorrência deste fato e considerando que os meios de cultura correntemente em uso não excluem seletivamente este biotipo, limites de estreptococos fecais para águas recreacionais baseados em densidades inferiores a 100/100 ml devem ser analisados com cautela, a menos que a determinação de coliformes fecais tenha sido efetuada paralelamente, comprovando a ocorrência de contaminação fecal, ou tenha sido efetuada a caracterização bioquímica dos estreptococos fecais, sendo excluída a possibilidade de predominância de S. faecalis subsp liquefaciens.

A.3. Esquema geral para identificação de estreptococos fecais.

Conforme salientado anteriormente, a especificação de estreptococos fecais pode fornecer subsídios complementares para determinação da origem da contaminação fecal, sendo apresentado a seguir, a título de informação, o esquema geral para essa identificação.



#### A.4. Seleção de diluições

Para amostras de águas não potáveis, um mínimo de 3 séries de 5 tubos devem ser inoculadas com volumes adequados da amostra ou de suas diluições. A seleção desses volumes decimais da amostra é feita pelo analista com base em sua experiência sobre a provável densidade de estreptococos fecais presentes, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada e/ou sobre dados prévios sobre a amostra. É fundamental que sejam selecionadas com cuidado as porções decimais a serem inoculadas, para que resultados numéricos significativos sejam obtidos; assim sendo, nos casos em que não se tem um conhecimento prévio sobre a amostra é recomendável a inoculação de um maior número de volumes decimais da mesma.

A.5. Cuidados especiais com a vidraria. Ver Norma CETESB M 1001-Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

A.6. Cuidados no preparo de meios de cultura

A azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), contida nos meios de cultura para detecção de estreptococos fecais, é uma substância altamente tóxica e precauções devem ser tomadas no sentido de se evitar contato com a mesma, especialmente por inalação do pó fino desprendido durante a preparação dos meios. Meios contendo azida sódica não devem ser misturados com ácido inorgânico forte, porque pode ser produzido um ácido tóxico (ácido hidrazólico -  $\text{HN}_3$ ).

A.7. Controle de qualidade da água destilada.

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos. Ver norma CETESB L 5.215 - Prova de adequabilidade da água destilada.

A.8. Controle de qualidade de meios de cultura.

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle de qualidade dos meios de cultura a serem empregados no teste para determi

nação do NMP de estreptococos fecais. Ver Norma CETESB L 5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

**A.9. Técnica de Tubos Múltiplos - Avaliação dos resultados.**

Os diferentes códigos correspondentes às combinações de resultados positivos e negativos, empregados para cálculo do NMP, têm diferentes expectativas de ocorrência e a análise dos códigos obtidos no laboratório fornece informações sobre a precisão dos técnicos na execução da análise e adequação da técnica ao tipo de amostra de água analisada. Ver norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de Análises Bacteriológicas da Água.

RENOVAGAD

ANEXO B

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 15 ed. Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1980. p. 747 - 925.
- B-2. BLAZEVIC, D.J.; EDERER, G.M., Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. John Wiley & Sons, S.B., 1975, 136 p.
- B-3. BORDNER, R. & WINTER, J. (ed) Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, 1978. 308 p. (EPA-600/8-78-017).
- B-4. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. ed. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1974. 1268 p.
- B-5. CABELLI, V.J. Indicators of recreational water quality. In: HOADEEY, A.W., DUTKA, J.B. (ed) Bacterial indicators/health hazards associated with water. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1977. 356 p.
- B-6. CETESB, São Paulo. Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de análises de água. São Paulo, 1978. 81 p.
- B-7. \_\_\_\_\_. Guia de orientação para coleta e preservação de amostras. São Paulo, 1982. 201 p.
- B-8. \_\_\_\_\_. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978. (NT L5. 010)
- B-9. \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979. (NT. L 5.216).
- B.10. \_\_\_\_\_. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1978 (NT. M 1001)
- B.11. \_\_\_\_\_. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1978 (NT. L5.215).

- B-12. CLAUSEN; E.M.; GREEN, B.L.; LITSKY;W. Fecal streptococci: Indicators of pollution. In: HOADLEY, A.W.; DUTKA, J.B. (ed) Bacterial indicators/health hazards associated with water: Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1977. 356 p.
- B-13. COWAN.S.T. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, University Press, 1970. 217 p.
- B-14. DIFCO LABORATORIES, Detroit. Difco manual-dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10 ed. Detroit, 1984. 1155 p.
- B-15. DORAN,J.W.; LINN,D.M. Bacteriological quality of runoff water from pastureland. Applied and Environmental Microbiology, 37 (5): 985-991, 1979.
- B-16. FEACHEM, R. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. Water Res. 9: 689-690, 1975 .
- B-17. GELDREICH,E.E. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in wastes discharges and receiving waters. CRC Critical Rev. Environ. Control, 6: 349 - 369, 1976.
- B-18. GELDREICH,E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2. ed. U.S. Environmental Protection Agency, 1975. 195 p.(EPA-670/9-75-006).
- B-19. GELDREICH,E.E.;KENNER,B.A. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. Journal Water Pollution Control Federation, 41: 336-352, 1969.
- B-20. GELDREICH,E.E; KENNER;B.A. & KABLER,P.W. Occurrence of coliforms, fecal coliforms and streptococci on vegetation and insects. Applied Microbiology 12: 63-69, 1964.
- B-21. ISO. Water quality-Detection and enumeration of presuntive group D streptococci - Part 2: Method by membrane filtration. 1983, (DRAFT INTERNATIONAL STANDARD - ISO/DIS 7899/2 - ISO/TC-147).
- B-22. KONEMAN,E.W.; ALLEN,S.D.; DOWELL Jr., V.R. & SOMMERS,H.M. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, J.B. Lippincott,Co., 1979. 495 p.

- B-23. MANUFACTURING CHEMISTS ASSOCIATION. Guide for safety in chemical laboratory. 2. ed. Van Nostrand Reinhold, 1972. 505 p.
- B-24. MARTINS, M.T.; ALVES, M.N., BANCHEZ, P.S. & SATO, M.I.Z. Evaluation of the fecal coliforms/fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical river. Rev. Microbiol., 15 (2):94-102, abr./jun., 1984.
- B-25. PAVLOVA, M.T.; BREZENSKY, F.T. & LITSKY, W. Evaluation of various media for isolation, enumeration and identification of fecal streptococci from natural sources. Health Laboratory Science, 9: 289-298, 1972.
- B-26. PTAK, D.J.; GINSBURG, W. Bacterial indicators of drinking water quality. In: HOADLEY, A.W.; DUTKA, J.B. (ed) Bacterial indicators/health hazards associated with water: Philadelphia, American Society for Testing and Materials. 1977. 356 p.
- B-27. TRAINING Manual. Current practices in water microbiology. Ohio, Environmental Protection Agency, 1973. p.i.
- B-28. WEISS, G. Hazardous chemical data book. Park Ridge, Noyes Data Corporation, 1980. 1.188 p.
- B-29. WHEATER, D.W.F.; MARA, D.D. & ORAGUI, J. Indicator systems to distinguish sewage from stormwater runoff and human from animal faecal material. In: proceedings of a Symposium on BIOLOGICAL INDICATORS OF WATER QUALITY. Univ. of New Castle upon Tyne, 2, 1978. p. 21.1 - 21.26.
- B-30. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. Geneva, 1984. 128 p.