



NORMA TÉCNICA

L5.240

Abr/1991
17 PÁGINAS

Coliformes totais e fecais: detecção em amostras de água através do teste de presença-ausência: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	COLIFORMES TOTAIS E FECAIS - DETECÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA ATRAVÉS DO TESTE DE PRESENÇA-AUSÊNCIA Método de ensaio	L5.240 ABR/91
--------	--	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução	1
1 Objetivo	2
2 Normas e documento complementares.....	2
3 Definições	2
4 Aparelhagem	3
5 Reagentes	6
6 Execução do ensaio	8
7 Resultados	11
Anexo A - Recomendações de ordem geral.....	13
Anexo B - Referências bibliográficas	15

INTRODUÇÃO

Desde o início da bacteriologia sanitária - marcada pela observação de Escherich, em 1885, de que o Bacillus coli (Escherichia coli) poderia ser usado como um indicador de contaminação fecal da água - as bactérias do grupo coliforme têm sido extensivamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas, sendo até hoje o parâmetro microbiológico básico incluído nas legislações relativas a águas para consumo humano.

Em relação aos métodos convencionais recomendados para a quantificação dos coliformes nesse tipo de água, incluem-se a técnica de tubos múltiplos e a de membrana filtrante. No entanto, a ampla utilização dos mesmos tem demonstrado a ocorrência de fatores interferentes em ambos os métodos.

O reconhecimento das possíveis limitações desses métodos convencionais tem determinado a constante pesquisa de novas metodologias e, nesse sentido, foram publicados, já em 1968, os resultados de um estudo efetuado no Canadá, relativo à implantação de um teste qualitativo simplificado para a detecção de coliformes (teste de presença-ausência). Os resultados dessa pesquisa e de vários outros estudos comparativos desta metodologia com as técnicas de membrana filtrante e de tubos múltiplos têm demonstrado a boa sensibilidade do teste P-A, tendo o mesmo sido incluído, em 1989, na legislação americana na como um método alternativo para detecção de coliformes em águas

de consumo humano. Em nosso país, essa inclusão ocorreu na legislação federal publicada em 1990, relativa ao monitoramento da qualidade de águas de abastecimento público.

Além da boa sensibilidade, a facilidade de execução e o menor custo são fatores de importância a serem considerados na aplicação deste teste, principalmente em pequenas comunidades em que são escassos os recursos econômicos.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para a detecção de coliformes (totais e fecais) em amostras de água, através do teste de Presença-Ausência (P-A), com aplicação na avaliação da qualidade bacteriológica de águas destinadas a consumo humano.

2 NORMAS E DOCUMENTO COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma, é necessário consultar:

- L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem
- L5.010 - Avaliação de laboratório de análises bacteriológicas de água
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura
- L5.231 - Coliformes e outros indicadores bacteriológicos - Detecção em amostras de água através do teste de presença-ausência
- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.6.

3.1 Coliformes totais

Grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativo, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades simi-

lares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35°C em 24-48 horas. O grupo inclui os seguintes gêneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella.

3.2 Coliformes fecais ou coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas. O principal componente deste grupo é Escherichia coli, sendo que alguns coliformes do gênero Klebsiella apresentam também essa capacidade.

3.3 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.4 Coloração de Gram

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

3.5 Esporos

Estruturas especializadas que se formam em certas bactérias Gram-positivas sob condições de nutrição inadequadas. Os esporos não apresentam atividade metabólica e são muito mais resistentes aos efeitos do calor, dessecação, congelamento, drogas deletérias e radiações, que as próprias células que os formam.

3.6 Oxidase

Enzima oxidativa da cadeia respiratória de bactérias, requerida para a oxidação do citocromo-c. No teste de pesquisa da oxidase, o citocromo-c, em sua forma oxidada, cataliza a oxidação do tetra-metil-p-fenilenodiamina, formando uma substância de coloração azul.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesadas 150 g¹.

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.

4.1.2 Banho-maria (44,5°C)

Equipado com termostado e agitador de baixa velocidade para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme ($44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$)² em todos os pontos.² O nível de água no banho-maria deve ser mantido acima do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio, imersos para incubação, sendo recomendada a troca semanal dessa água para evitar a proliferação de fungos e outros microrganismos.

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, cuja condutividade deve ser inferior a $2 \mu\text{mhos}/\text{cm}^2$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa ($1,05 \text{ kgf}/\text{cm}^2$ ou $15 \text{ lb}/\text{pol}^2$), produzindo, em seu interior, uma temperatura de $121,6^\circ\text{C}$ ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.4.2 Estufa de esterilização

Deve manter a temperatura de ($170 \pm 10^\circ\text{C}$) durante o período de esterilização (mínimo de 2 horas).

4.1.5 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a umidade relativa entre 75 a 85% e ser colocada em um local onde a temperatura

² Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros devem ser graduados com intervalos de escala de $0,1^\circ\text{C}$. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.

permaneça na faixa de 16 a 27°C.³

4.1.6 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0, pH = 6,86 ou pH = 9,18).

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para o preparo de meios de cultura.

4.2.2 Frascos para o meio presuntivo (Caldo P-A)

De vidro neutro, borossilicato ou plástico autoclavável, com tampas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis; devem ter volume suficiente para conter 50 mL do caldo P-A e 100 mL da amostra a ser analisada, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização, quando se fizer a agitação.

4.2.3 Frasco para coleta de amostra

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

4.2.4 Tubos de Durham

De borossilicato ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro do tubo de ensaio em cujo interior serão utilizados.

4.2.5 Tubos de ensaio

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para conter o meio de cultura e o inóculo da amostra.

Nota: Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm e de 12 mm x 120 mm.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7 a 8 cm de comprimento, com uma alça de 3 mm de diâmetro na

3 A verificação da temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetro (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocado em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima na parte central da mesma. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).⁴

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Estantes

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.5 Estojo para pipetas

Usar, para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel kraft para esterilização.

4.3.6 Tela de amianto

4.3.7 Termômetros

4.3.8 Tripé

5 REAGENTES

5.1 Meios de cultura

Nota: Para o preparo dos meios de cultura devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório a partir de seus componentes específicos, devendo ser utilizadas, para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a.).

5.1.1 Caldo P-A (concentração tripla)

5.1.1.1 Fórmula

Caldo lactosado (meio desidratado).....	39,0 g
Caldo lauril triptose (meio desidratado).....	52,5 g
Púrpura de bromocresol.....	0,0255 g

⁴ Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. Após o uso, as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e descartadas. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante 3 horas.

Água destilada..... 1 000 mL
 pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

5.1.1.2 Preparo

Pesar e dissolver os meios desidratados caldo lactosado e caldo lauril triptose, seqüencialmente, em água destilada, sem aquecimento e sob agitação. Dissolver a púrpura de bromocresol em 10 mL de uma solução 0,1N de hidróxido de sódio e adicionar ao meio acima. Distribuir, em frasco adequado, com capacidade de 250 mL (contendo em seu interior tubos de ensaio de 12 x 120 mm em posição invertida) volumes adequados para a obtenção de 50 mL após autoclavação. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos..

5.1.2 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%

5.1.2.1 Fórmula

Peptona.....	10,0 g
Lactose.....	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	20,0 g
Verde brilhante.....	0,0133 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C	

5.1.2.2 Preparo

Pesar 40,0 g do meio desidratado caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, 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, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.⁵

5.1.3 Meio E.C.

5.1.3.1 Fórmula

Triptose ou trypticase.....	20,0 g
Lactose.....	5,0 g
Mistura de sais biliares ou sais bilares nº3.....	1,5 g

⁵ No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e a esterilização não deve exceder duas horas.

Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	4,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	1,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a $25^\circ C$

5.1.3.2 Preparo

Pesar 37,0 g do meio E.C. desidratado e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 5 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a $121^\circ C$, durante 15 minutos.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Sumário do método

O método baseia-se na inoculação de volumes de 100 mL da amostra em frascos adequados, contendo 50 mL do meio presuntivo caldo P-A em concentração tripla. A incubação é feita a $35^\circ C$, sendo realizadas leituras após 24-48 horas. A acidificação do meio, evidenciada pela mudança de sua coloração de roxa para amarela, com ou sem produção de gás, é considerada resultado positivo para coliformes. A confirmação deste resultado é feita transferindo-se um inóculo das culturas presuntivas positivas para caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%, sendo a produção de gás nesse meio, após 24-48 horas de incubação a $35^\circ C$, o resultado confirmativo para coliformes totais. Para a determinação de coliformes fecais, um inóculo da cultura presuntiva positiva é transferido para o meio E.C., o qual é incubado a $44,5^\circ C$ durante 24 horas, sendo a produção de gás a essa temperatura considerada como resultado positivo para esse sub-grupo de bactérias.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988.

6.2.1 Amostra

6.2.1.1 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 ne

cessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.2.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio anidro para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 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 tiossulfato é requerida. Nestes 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 essa quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

6.2.1.3 Agentes quelantes: para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, 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 coleta 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.

6.2.1.4 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e início de 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.

6.3 Procedimento

6.3.1 Exame presuntivo

6.3.1.1 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

6.3.1.2 Dispor sobre a bancada de trabalho material necessário à

execução da análise, a saber:

6.3.1.2.1 Frascos contendo 50 mL de caldo P-A, identificados com o número da amostra.

6.3.1.2.2 Provetas graduadas estéreis com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra.

6.3.1.2.3 Bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico.

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

6.3.1.4 Dosar 100 mL da mesma em proveta estéril⁶ e proceder à inoculação, vertendo cuidadosamente esse volume da amostra no frasco contendo o caldo P-A, tomando cuidado para que não ocorra entrada de ar no tubo de Durham contido no interior do frasco.

6.3.1.5 Após a inoculação das amostras, efetuar sua incubação a 35°C, durante 24 horas.

6.3.1.6 Após esse período de incubação, efetuar a 1ª leitura, considerando como resultado positivo a acidificação do meio (evidenciada pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo), com ou sem produção de gás. Se os resultados forem negativos, retornar os frascos à incubadora por mais 24 horas, efetuando, após esse período, a leitura final, conforme especificado acima.

6.3.1.7 Submeter as culturas com resultado presuntivo positivo aos testes confirmativos, para a determinação de coliformes totais e para a diferenciação de coliformes fecais, conforme descrito no item 6.3.2, devendo ser observados os seguintes cuidados gerais em sua execução:

- a) antes da transferência de inóculos das culturas positivas em caldo P-A para os meios confirmativos, verificar se o crescimento bacteriano se apresenta uniformemente distribuído no meio de cultura ou se se encontra sedimentado no fundo do frasco; neste último caso, é requerida uma leve agitação do frasco, para a redispersão das bactérias; e
- b) imediatamente após a abertura do frasco contendo as cul

⁶ Se, para conter o Caldo P-A, for usado um frasco com graduação externa correspondente ao volume final de 150 mL (50 mL do meio mais 100 mL da amostra), não é requerida a dosagem prévia do volume da amostra a ser analisado, sendo o mesmo vertido diretamente no frasco.

turas positivas em Caldo P-A, flambar a boca do mesmo antes de colher os inóculos; repetir essa operação antes de seu fechamento.

6.3.2 Exames confirmativos para coliformes totais e fecais.

6.3.2.1 Com auxílio de uma alça de inoculação⁷, devidamente flambada e resfriada, retirar um inóculo da cultura positiva em caldo P-A.

6.3.2.2 Transferir esse inóculo para um tubo contendo caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e outro para um tubo com meio E.C.⁸.

6.3.2.3 Após a inoculação, incubar o caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h e o meio E.C. a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, em banho-maria com agitação, durante 24 h.

6.3.2.4 Após os períodos determinados de incubação, efetuar as leituras, considerando resultado positivo para coliformes totais a produção de gás a partir da fermentação da lactose no meio caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%; coliformes fecais estão presentes se houver produção de gás no meio E.C.

7 RESULTADOS

7.1 Para coliformes totais, o resultado final é emitido com base nos resultados obtidos no caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%, sendo expresso como: **Presença (ou ausência) de coliformes totais/100 mL.**

7.2 Para coliformes fecais, o resultado final é baseado no meio E.C., sendo expresso como: **Presença (ou ausência) de coliformes fecais/100 mL.**

/ANEXO A

⁷ Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira (ver nota de rodapé nº 4).

⁸ O meio E.C. deve ser mantido em banho maria a $44,5^{\circ}\text{C}$ durante um mínimo de 30 minutos antes de sua utilização.

REVOGADA

ANEXO A - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALA.1 Controle de qualidade analítica

A.1.1 Programas sistemáticos de controle de qualidade analítica constituem uma atividade de fundamental importância em laboratórios de análises bacteriológicas da água, dada a importância dos dados gerados e sua implicação em termos de saúde pública.

A.1.2 Considerando a diversidade de atividades desenvolvidas no laboratório, o controle de qualidade atua como suporte, visando eliminar ou reduzir erros que possam ocorrer em qualquer atividade laboratorial, seja devido a pessoal, equipamentos, materiais ou reagentes, garantindo, dessa forma, a qualidade do trabalho desenvolvido, desde a coleta da amostra até a emissão dos resultados.

A.1.3 Para o desenvolvimento de um programa de controle de qualidade analítica em laboratórios de análises microbiológicas de água, os seguintes itens devem ser considerados:

- a) controle de qualidade de equipamentos;
- b) lavagem, preparo e esterilização de materiais;
- c) controle de qualidade de meios de cultura, através de testes como o de hidrólise da lactose, sensibilidade, especificidade e esterilidade;
- d) controle de qualidade da água destilada;
- e) controle de qualidade de materiais;
- f) avaliação da precisão dos técnicos na execução de análises; e
- g) avaliação da qualidade do detergente.

A.1.4 Todas as informações necessárias relativas aos procedimentos citados estão descritos nas seguintes Normas Técnicas:

- a) Norma Técnica CETESB L5.010 - Avaliação de laboratório de análises bacteriológicas de água;
- b) Norma Técnica CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- c) Norma Técnica CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- d) Norma Técnica CETESB L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergente para lavagem; e
- e) Norma Técnica CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

A.2 Aplicação do teste P-A para detecção de outros indicadores

O teste de presença-ausência pode ser aplicado para a determinação de outras bactérias de interesse sanitário, como estreptococos fecais, Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas e Staphylococcus aureus. Para isso, a partir da cultura presuntiva positiva em caldo P-A, são efetuados testes confirmativos específicos para cada um desses grupos de bactérias. O procedimento completo para detecção desses indicadores é descrito na Norma Técnica CETESB L5.231 - Coliformes e outros indicadores bacteriológicos - Detecção em amostras de água através do teste de presença-ausência.

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Microbiological examination of water. In: - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, p. 827-1038, 1985.
- B-2 BISSONETTE, G.K.; JEZESKI, J.J.; McFETERS, G.A. & STUART, D.G. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Appl. Microbiol., 29: 186-194, 1975.
- B-3 BRASIL, Leis, Decretos...Portaria nº 36. Dispõe sobre as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observadas em todo território nacional. Brasília, Diário Oficial da União, 19 de janeiro de 1990.
- B-4 BURMAN, N.P. Developments in membrane filtration techniques, II. Adaptation to routine and special requirements. Proc.Soc. Water Treatment and Examination, 16: 40-50, 1967.
- B-5 CETESB. Coliformes totais - Determinação pela técnica de membrana filtrante, São Paulo, 1984, 1ª Revisão (Norma Técnica L5.214).
- B-6 _____. Coliformes e outros indicadores - Detecção em amostras de água através do teste de Presença-Ausência, São Paulo, 1991 (Norma Técnica L5.231).
- B-7 _____. Coliformes totais e fecais - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos, São Paulo, 1984, 1ª Revisão (Norma Técnica L5.202).
- B-8 _____. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988, 150p.
- B-9 _____. Staphylococcus aureus - Determinação pela técnica de membrana filtrante, São Paulo, 1986 (Norma Técnica L5.206).
- B-10 COLLINS H.C.; LYNE M.P. & GRANGE M.J. Microbiological Methods.

6^a ed. London, 1989.

- B-11 CLARK, J.A. A Presence-absence (P-A) teste providing sensitive and inexpensive detection of coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci in municipal drinking water supplies. Can. Jour. Microbiol., 14: 13-18, 1968.
- B-12 CLARK, J.A. The detection of various bacteria indicative of water pollution by a presence-absence (P-A) procedure. Can. Jour. Microbiol., 15: 771-780, 1969.
- B-13 CLARK, J.A. Presence-absence (P-A) procedure for detection of indicator bacteria in drinking water supplies. Apostila mi meografada, 1983 37 p.
- B-14 CLARK, J.A. The influence of increasing number of nonindicator organisms upon the detection of indicator organisms by the membrane filter and presence-absence tests. Can. Jour. Microbiol., 26: 827-832, 1980.
- B-15 CLARK, J.A.; BURGER, C.A. SABATINOS, L.E. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water, and new main water samples. Can. Jour. Microbiol., 28: 1102-1013, 1982.
- B-16 EVANS, T.M.; SEIDLER, R.J. & Le CHEVALLIER, M.W. Impact of verification media and resuscitation on occuracy of the membrane filter total coliform enumeration technique. Appl. Environ. Microbiol., 41: 1114-1151, 1981.
- B-17 FEDERAL REGISTER. Drinking Water: National Primary Drinking Water Regulations: Total Coliforms (Including Fecal Coliforms and E.coli) - Final Rule. United States, Environmental Protection Agency, 40: (41-142), JUne 29, 1989.
- B-18 JACOBS, J.N.; ZEIGLER, L.W.; REED, C.F.; STUKEL, A.T. & RICE, W.E. Comparison of membrane filter, multipli-fermentation-tube, and presence-absence technique for detecting total coliforms in small community water systems. Appl. Environ. Microbiol., 51: 1007-1012, 1986.

- B-19 McFETERS, G.A.; CAMERON, S.C. & LeCHEVALLIER, M.W. Influence of diluents, media and membrane filters on the detection of injured waterborne coliform bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 43: 97-103, 1982.
- B-20 MORGAN, G.B.; GUBBINS, P. & MORGAN, V. A critical appraisal of the membrane filter technic. Health Lab. Sci., 2: 227-237, 1965.
- B-21 PELLIZARI, V.H. Comparação entre o teste de presença-ausência (P-A) e o teste de membrana filtrante para caracterização bacteriológica de águas tratadas. Monografia - Organização Santamarense de Educação e Cultura, São Paulo, 1986. 70p.
- B-22 PIPES, W.O. & CHRISTIAN, R.D. Estimating mean coliform densities of water distribution systems. J. Amer. Water Works Assoc., 76: 60-64, 1984.
- B-23 SHIPE, E.L. & CAMERON, G.M. A comparison of the membrane filter with the most probable number method for coliform determinations from several waters. Appl. Microbiol., 2: 85-88, 1984.
-