



# NORMA TÉCNICA

L5.531

Dez/1992  
13 PÁGINAS

E. coli: teste de fluorescência, baseado na detecção da enzima B-D glucoronidase, para diferenciado de colônias de outros coliformes (técnica de membrana filtrante) - 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	<b><u>E. coli</u> - TESTE DE FLUORESCÊNCIA, BASEADO NA DETECÇÃO DA ENZIMA <math>\beta</math>-D GLUCORONIDASE, PARA DIFERENCIAÇÃO DE COLÔNIAS DE OUTROS COLIFORMES (TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE) - Método de ensaio</b>	L5.531 DEZ/92
--------	--	------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Documentos complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Meios de cultura.....	6
6 Execução do ensaio.....	7
7 Resultados.....	9
Anexo A - Prescrições gerais.....	11
Anexo B - Referências bibliográficas.....	12

#### INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, o grupo coliforme foi a ferramenta básica utilizada pelos sanitaristas na detecção de contaminação fecal no ambiente aquático, tendo sido a ocorrência dessas bactérias em elevadas densidades nas fezes e sua associação freqüente à presença de patógenos, as características básicas deste grupo, responsáveis pela sua seleção como o melhor indicador de contaminação fecal.

No entanto, a generalidade da definição proposta para esse grupo englobando todos os bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 horas a 35°C, comprometeu a utilização destas bactérias como indicador específico de contaminação fecal. Adotada desde 1917, essa definição deu margem a que fossem incluídos nesse grupo, além de E. coli, outros gêneros de coliformes (Enterobacter, Citrobacter e Klebsiella), cuja origem não é exclusivamente fecal.

O reconhecimento deste fato levou ao desenvolvimento de métodos para a enumeração de um subgrupo dos coliformes, denominados coliformes fecais, sendo a base para a diferenciação dos mesmos a verificação de sua capacidade de fermentação da lactose também em temperatura elevada (44,5°C).

Embora a utilização dos coliformes fecais, em substituição aos coliformes totais, tenha determinado uma melhoria significativa na detecção da contaminação de origem fecal, logo se tornou evidente a existência de outros coliformes termotolerantes, principalmente Klebsiella,

os quais, por não serem de origem exclusivamente fecal, comprometiam a especificidade desse subgrupo para a finalidade proposta.

Em decorrência disto, as tendências atuais se direcionam para a detecção específica de E. coli, que é o único componente do grupo coliforme de origem exclusivamente fecal.

Nesse sentido, para águas de abastecimento público - para cuja avaliação permanecem os coliformes totais como o parâmetro microbiológico básico, reconhecida a sua utilidade como um critério no controle de parâmetros operacionais nos processos de tratamento de água - são mantidos os métodos convencionais para a quantificação deste grupo de bactérias (técnicas de tubos múltiplos e de membrana filtrante), ao lado de métodos alternativos para essa finalidade (Teste de Presença-Ausência), sendo propostas alterações ou novas técnicas para a diferenciação de E. coli, a partir das culturas positivas de coliformes totais obtidas através desses métodos.

Nesta Norma é descrito um teste baseado na detecção da enzima  $\beta$ -D glucoronidase, que permite a diferenciação de E. coli de outras colônias de coliformes totais, obtidas a partir da aplicação da técnica de membrana filtrante, com os meios de cultura convencionais (meios tipo Endo). Entre as bactérias que compõem o grupo dos coliformes, E. coli é a única capaz de produzir a enzima  $\beta$ -D glucoronidase (GUR). Em 1982, Feng e Hartman mostraram que o substrato MUG (4 metilumbeliferil  $\beta$ -D glucoronídeo) poderia ser adaptado a metodologias para detecção de E. coli. Esse substrato, quando na presença da enzima  $\beta$ -D glucoronidase, é clivado, sendo liberada a substância 4 metilumbeliferona, a qual, sob exposição à luz ultravioleta (366 nm), produz uma fluorescência azul brilhante. As porcentagens de E. coli que produzem reação positiva no teste para pesquisa dessa enzima dependem do substrato utilizado para detecção de sua atividade e das cepas de E. coli presentes na amostra. Aproximadamente 94 a 95% das E. coli isoladas de amostras ambientais e de amostras clínicas são GUR positivas, quando testadas utilizando o MUG como substrato. Cepas de E. coli que não apresentam reação positiva neste teste incluem o sorotipo O157:H<sub>7</sub>, responsável pela colite hemorrágica, e certas outras cepas intestinais.

## 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve um teste baseado na detecção da enzima  $\beta$ -D glucoronidase, para diferenciação de E. coli de outras colônias de coliformes totais obtidas no M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), a partir da aplicação da técnica de membrana filtrante, para águas destinadas a consumo humano.

## 2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.214 - Coliformes totais - Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante, 1992.
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura, 1987.
- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia, 1986.
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB, 1988.

## 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.4.

### 3.1 Grupo coliforme

Inclui todos os bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose com produção de gás em 24-48 horas a 35°C. Neste grupo são incluídos os seguintes gêneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella.

### 3.2 Coliformes fecais ou coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar 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.

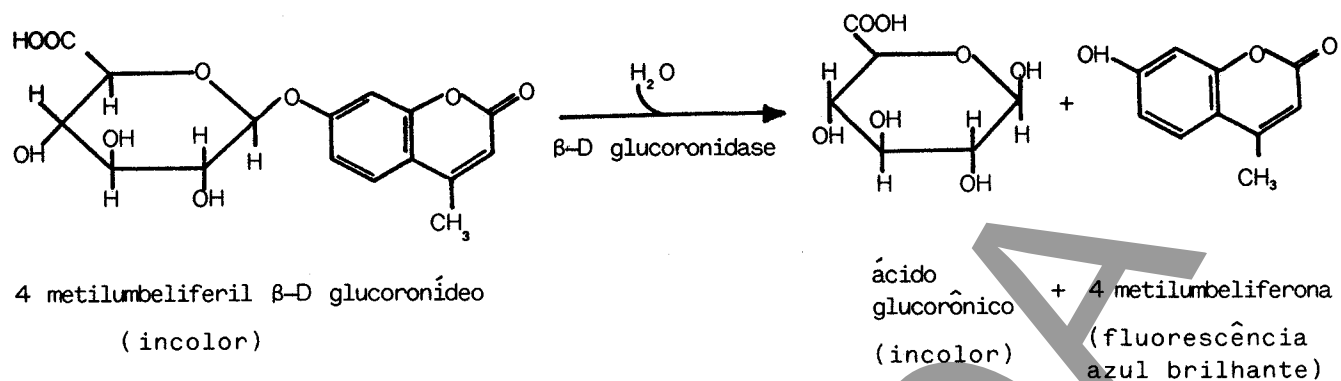
### 3.3 Escherichia coli (E. coli)

Principal componente do subgrupo dos coliformes fecais ou coliformes termotolerantes, capaz 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. Em relação à metodologia descrita nesta Norma, são consideradas de E. coli as colônias típicas em M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo) que - após incubação a 35°C, durante 4 horas, da membrana transferida desse meio para a superfície de uma placa contendo Ágar Nutriente com MUG - apresentarem fluorescência azul em suas bordas, quando expostas à luz ultravioleta (366 nm).

### 3.4 MUG (4 metilumbeliferil $\beta$ -D glucoronídeo)

Substrato utilizado nesta metodologia para diferenciação de colônias de E. coli de colônias de outros coliformes, que se desenvolveram no M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo). Este substrato é incorporado ao meio Ágar Nutriente (0,1 g/L), para cuja superfície é transferida a membrana filtrante contendo as colônias de coliformes totais. Entre os coliformes, E. coli é a única bactéria que possui a enzima  $\beta$ -D glucoronidase, requerida para a hidrólise do MUG, que ocorre segundo a seguinte

te reação:



#### 4 APARELHAGEM

##### 4.1 Equipamentos

###### 4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.<sup>1</sup>

###### 4.1.2 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 μS/cm 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.

###### 4.1.3 Equipamentos para esterilização

###### 4.1.3.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm<sup>2</sup> ou 15 lb/pol<sup>2</sup>), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°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.

###### 4.1.3.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura de (170 ± 10°C) durante o período de esterilização.

<sup>1</sup> 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. Sua aferição deve ser feita periodicamente.

lização (mínimo de duas horas).

#### 4.1.4 Incubadora bacteriológica termostatzada

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 permaneça na faixa de 16 a  $27^{\circ}\text{C}$ .<sup>2</sup>

#### 4.1.5 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).

#### 4.1.6 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 1 a  $10^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 Vidraria

#### 4.2.1 Balões

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

#### 4.2.2 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.

#### 4.2.3 Placa de Petri

De borossilicato ou vidro neutro de boa qualidade, que não apresente fluorescência quando exposto à luz U.V., com 15 mm de altura e 100 mm de diâmetro.

### 4.3 Outros materiais

#### 4.3.1 Bicos de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

#### 4.3.2 Lâmpada ultravioleta

Lâmpada ultravioleta com comprimento de onda longo (366 nm), preferencialmente de 6 watts.<sup>3</sup> Para a leitura da fluorescência, essa lâmpada deve ser adaptada no interior de uma caixa ou sala escura.

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

<sup>3</sup> Com lâmpadas de 4 W, a fluorescência se mostra mais fraca, dificultando a leitura do teste positivo e, com lâmpadas de 15 W, podem ocorrer interferências, causando resultados falsos positivos.

4.3.3 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.4 Placas de Petri

De plástico não tóxico, bem vedadas, de 48 mm de diâmetro x 8,5 mm de altura.

4.3.5 Tela de amianto4.3.6 Tripé4.3.7 Termômetros4.3.8 Zaragatoa

Hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro com uma de suas extremidades revestida com algodão hidrófilo. Antes do uso, devem ser esterilizadas por calor seco (170-180°C durante 2 horas) e, após o uso, devem ser autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e descartadas.

5 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 utilizados, para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a.).

5.1 Ágar nutriente com MUGFórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Ágar.....	15,0 g
MUG (4 metil umbeliferil β-D glucoronídeo).....	0,1 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 6,8 ± 0,1 a 25°C.	

Preparo:

Adicionar 23,0 g do meio desidratado Ágar Nutriente com MUG a um litro de água destilada e misturar bem. Aquecer em banho-maria fervente, até a completa dissolução do ágar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 4 mL em placas de Petri de plástico de 48 x 8,5 mm.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Para isolamento de colônias de coliformes, nos casos em que se verificou crescimento confluyente no M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), distribuir volumes de 12 mL do meio Ágar Nutriente com MUG em Placas de Petri de 15 x 150 mm.

Alternativamente, pode ser adicionado 0,1 g de MUG ao meio Ágar Nutriente desidratado, no caso de não se dispor desse meio já contendo o MUG incorporado em sua composição.<sup>5</sup>

#### Armazenamento:

Se o meio contido nas placas de Petri não for usado imediatamente, deve ser armazenado em refrigerador durante, no máximo, duas semanas. Nesse caso, o meio armazenado deve ser incubado a 35°C de um dia para outro, antes do uso, devendo ser descartadas as placas nas quais se verificou crescimento.

## 6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 6.1 Sumário do método

O teste descrito nesta Norma permite a diferenciação de E. coli de outras colônias de coliformes totais obtidas no M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), a partir da aplicação da Técnica de Membrana Filtrante, para águas destinadas a consumo humano.

Nesta técnica, descrita na Norma L5.214, um volume adequado da amostra é filtrado através de uma membrana filtrante com porosidade de 0,45 µm. Após a filtração, a membrana, contendo as células bacterianas em sua superfície, é transferida para uma placa de Petri contendo M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), sendo incubada a 35 ± 0,5°C durante 24 ± 2 horas. Após esse período de incubação, para a realização do teste de diferenciação de E. coli, a membrana filtrante, contendo as colônias típicas de coliformes totais, é transferida para a superfície de uma placa de Petri contendo Ágar Nutriente com MUG. A produção de fluorescência azul brilhante ao redor das colônias típicas, após um período de incubação adicional de 4 horas a 35°C, indica a presença de E. coli. As colônias com halo fluorescente são observadas e/ou contadas sob exposição a luz ultravioleta (366 nm).

### 6.2 Amostragem e amostra

O teste descrito nesta Norma é um procedimento efetuado em continuidade de a uma análise precedente (determinação de coliformes totais pela técnica de membrana filtrante), descrita na Norma L5.214, não envolvendo, portanto, a análise direta das amostras de água, razão pela qual os procedimentos relativos à coleta das mesmas, sua preservação e transporte não são incluídos na presente norma. No entanto, dada a importân

<sup>5</sup> O reagente MUG (4 metil umbeliferil β-D glucoronídeo deve ser estocado em local fresco e protegido de luz e umidade. Para armazenamento durante longo tempo, manter a -20°C. No manuseio desse reagente, evitar exposição, pois sua toxicidade é desconhecida.



cia dos mesmos para a obtenção de resultados válidos, é fundamental a estrita observação das recomendações apresentadas na Norma L5.214.

### 6.3 Procedimento

6.3.1 Após a contagem das colônias típicas de coliformes totais, que se desenvolveram no M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo),<sup>6</sup> e posterior transferência de um inóculo das mesmas para a realização dos testes confirmativos, conforme descrito na Norma L5.214, efetuar o teste para diferenciação das colônias de E. coli, baseado na detecção da enzima  $\beta$ -D glucuronidase.

6.3.2 Para isso, identificar uma placa de Petri contendo o meio Ágar Nutriente com MUG com o número da amostra e o número de colônias típicas de coliformes totais presentes na superfície da membrana correspondente à filtração dessa amostra.

6.3.3 Com o auxílio de uma pinça, cujas extremidades foram previamente flambadas e esfriadas, e observando todos os cuidados de assepsia, retirar a membrana filtrante da superfície do M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), tocando apenas na área periférica da mesma, fora da área de filtração.

6.3.4 Transferir essa membrana, para a superfície do Ágar Nutriente com MUG, contido em placa de Petri previamente identificada (item 6.3.2).

Nota: Ao efetuar essa transferência, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio de cultura. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar um movimento giratório da mesma, para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, levantar, com auxílio da pinça, a borda da membrana mais próxima à bolha, para que a mesma seja eliminada.

6.3.5 Após a transferência da membrana para a superfície do Ágar Nutriente com MUG, incubar a placa a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 4 horas.

6.3.6 Após o período de incubação, observar as colônias sob luz ultravioleta (366 nm). A formação de um halo fluorescente azul brilhante

<sup>6</sup> Nos casos em que não é possível efetuar a contagem das colônias típicas de coliformes em M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo), devido a crescimento confluyente, o teste para diferenciação de E. coli pode ser realizado, sendo obtidos apenas resultados qualitativos (presença ou ausência de E. coli). Nestes casos, com auxílio de uma zaragatoa estéril, efetuar a remoção do crescimento na superfície da membrana e transferi-lo para uma placa de Petri de 15 x 150 mm com Ágar Nutriente com MUG, girando a zaragatoa sobre uma pequena área da placa, estriando, em seguida, para isolamento de colônias. Incubar a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 12 a 24 horas e efetuar a leitura conforme descrito em 6.3.6.

te ao redor da colônia é considerada como resultado positivo para E. coli.

- Notas:
- a) se houver dúvidas quanto à fluorescência, adicionar algumas gotas de hidróxido de amônia na tampa da placa e aguardar por 1 ou 2 minutos para confirmar a fluorescência;
  - b) algumas espécies de Pseudomonas produzem fluorescência de cor verde, quando expostas à luz UV. Tomar cuidado para que esta não seja confundida com a fluorescência azul produzida pela 4 metilumbeliferona.

6.3.7 Efetuar a contagem das colônias de E. coli e registrar os resultados.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Cálculo

A densidade de E. coli em 100 mL da amostra é calculada através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de colônias de } \underline{E. coli} / 100 \text{ mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias com fluorescência azul brilhante}}{\text{volume filtrado da amostra}} \times 100$$

### 7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 O resultado final é expresso como:

Nº de colônias de E. coli em 100 mL da amostra.

7.2.2 Quando a contagem no meio M-Endo Agar LES (ou Ágar M-Endo) não foi efetuada devido a crescimento confluyente e foi realizado o teste para diferenciação de E. coli, conforme nota de rodapé nº 6, o resultado é expresso como:

Presença (ou ausência) de E. coli em 100 mL.

REVOGADA

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAISA-1 Técnica de membrana filtrante

Com respeito a informações complementares e recomendações de ordem geral, quanto à técnica de membrana filtrante para a determinação de coliformes, as mesmas estão detalhadas na Norma Técnica L5.214.

A-2 Controle de qualidade para o teste de diferenciação de E. coliA-2.1 Meio de cultura

Para controle de qualidade do meio de cultura Ágar Nutriente com MUG, filtrar uma suspensão de uma cultura-controle (E. coli), em uma densidade aceitável para a verificação das colônias. Colocar a membrana filtrante sobre o meio M-Endo Agar LES (ou M-Endo) e incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. Em seguida, transferir a membrana filtrante para o meio Ágar Nutriente com MUG. Incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. As colônias deverão apresentar a reação GUR positiva, com a formação de halo fluorescente azul brilhante sob a luz ultravioleta (366 nm).

A-2.2 Placa de Petri

Certos tipos de vidraria podem apresentar fluorescência, quando expostos à luz ultravioleta. Caso sejam utilizadas placas de Petri de vidro, fazer antes um teste para controle das mesmas antes do uso, expondo-as à luz ultravioleta, para assegurar que não haja interferência na análise.

---

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Microbiological examination. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 ed., Washington, APHA, AWWA, WEF, 1992, pg. 9-1 a 9-147.
- B-2 ADAMS, M.R.; GRUBB, S.M.; HAMER, A. & CLIFFORD, M.N. Colorimetric enumeration of Escherichia coli based on B-Glucoronidase activity. Appl. Environ. Microbiol., 56 (7): 2021-2024, 1990.
- B-3 BERG, J.D. & FIKSDAL, L. - Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-B-D-galactoside. Appl. Environ. Microbiol., 54 (8): 2118-2122, 1988.
- B-4 CETESB - Coliformes totais - Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante. São Paulo, 1992 (Norma Técnica L5.214, 1ª revisão).
- B-5 \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216, 1ª revisão).
- B-6 \_\_\_\_\_. Guia de coleta e preservação de amostras de água, da CETESB. São Paulo, 1988.
- B-7 \_\_\_\_\_. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1ª revisão).
- B-8 \_\_\_\_\_. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).
- B-9 COVERT, T.C.; SHADIX, L.C.; RICE, E.W.; HAINES, J.R. & FREYBERG, R.W. - Evaluation of the autoanalysis colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol., 55 (10): 2443-2447, 1989.
- B-10 EDBERG, S.C.; PISCITELLI, V.; CARTTER, M. - Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. Appl. Environ. Microbiol., 52, (3): 474-478, 1986.
- B-11 EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J. & SMITH, D.B. - Rapid, specific, defined substrate technology for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli. Toxicity Assess., 3: 565-580, 1988.

- B-12 EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J. & SMITH, D.B. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol., 55 (4): 1003-1008, 1989.
- B-13 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Test methods for Escherichia coli in drinking water: EC medium with MUG tube procedure - Nutrient agar with MUG-membrane filter procedure. Ohio: EPA/Environmental Monitoring Systems Laboratory, July 1991 (EPA 600/4-91/016).
- B-14 FENG, P.C.S. & HARTMAN, P.A. - Fluorogenic assays for immediate confirmation of Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol., 43 (6): 1320-1329, 1982.
- B-15 LEE, R.M. & HARTMAN, P.A. - Inexpensive, disposable presence-absence test for coliforms and Escherichia coli in water. J. Food Protection, 52 (3): 162-164, 1989.
- B-16 MATES, A. & SHAFFER, M. Membrane filtration differentiation of E. coli from coliforms in the examination of water. J. Appl. Bacteriol., 67: 343-346, 1989.
- B-17 OLSON, B.H.; CLARK, D.L.; MILNER, B.B.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L. Total coliform detection in drinking water: comparison of membrane filtration with colilert and coliquik. Appl. Environ. Microbiol., 57 (5): 1535-1539, 1991.
- B-18 RICE, E.W.; ALLEN, M.J.; BRENNER, D.J. & EDBERG, S.C. Assay for B-glucoronidase in species of genus Escherichia and its applications for drinking-water analysis. Appl. Environ. Microbiol., 57 (2): 592-593, 1991.
-