



NORMA TÉCNICA

L5.213

Jul/1993
28 PÁGINAS

Determinação do número mais provável de clostrídios sulfito-redutores (*Clostridium perfringens*): 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](http://www.cetesb.sp.gov.br)

	: <u>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</u> - DETERMINAÇÃO	:
CETESB	: EM AMOSTRAS DE ÁGUA PELA TÉCNICA DE	: L5.213
	: TUBOS MÚLTIPLOS	: JULHO/93
	: Método de ensaio	:

SUMÁRIO

Introdução

- 1 Objetivo
 - 2 Documentos complementares
 - 3 Definições
 - 4 Aparelhagem
 - 5 Meios de cultura e soluções
 - 6 Execução do ensaio
 - 7 Resultados
- Anexo A - Recomendações de ordem geral
 Anexo B - Referências bibliográficas

INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens tem sido utilizado como indicador bacteriológico de contaminação fecal, pois sua incidência no meio aquático está constantemente associada a dejetos humanos, sendo sua presença detectada em fezes, esgotos e águas poluídas.

Por serem esporuladas, essas bactérias apresentam grande resistência aos desinfetantes e às condições desfavoráveis do meio ambiente, e a excepcional longevidade de seus esporos na água é útil na detecção de contaminação fecal remota, em situações em que outros indicadores menos resistentes como E. coli já não estão mais presentes.

A pesquisa de Clostridium perfringens é recomendada como um complemento valioso para outros testes bacteriológicos de avaliação da qualidade da água, particularmente em certas situações específicas, entre as quais se incluem a análise de águas cloradas e águas não tratadas contendo resíduos industriais letais a bactérias não esporuladas, análise de amostras colhidas mais de 12 horas antes do início da análise e de amostras de lodos de esgoto. É de importância, também, a pesquisa deste indicador nas situações em que é desejável a detecção tanto de poluição fecal remota como recente, nos casos em que a drenagem dos solos e a ressuspensão de sedimentos não são significativas, bem como em estudos de sobrevivência de indicadores.

Em esgotos e águas poluídas, a densidade de Clostridium perfringens geralmente excede a de vírus entéricos e de bactérias patogênicas. Portanto, sua ausência em águas de abastecimento é uma indicação segura da ausência desses microrganismos, evidenciando, também, a eficiência do processo de tratamento de água aplicado.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve a Técnica dos tubos múltiplos utilizada na determinação do número mais provável (NMP) de Clostridium perfringens, com aplicação na:

- avaliação da qualidade de águas tratadas ou brutas destinadas a consumo humano;
- avaliação da qualidade de águas brutas contendo resíduos industriais letais a outros microrganismos indicadores;
- avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas;
- avaliação da eficiência de processos de tratamento de esgoto, na remoção de microrganismos;
- avaliação da qualidade de águas minerais;
- avaliação da qualidade da água utilizada na fabricação de produtos alimentícios;
- detecção de contaminação fecal remota.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- CETESB - Guia de coleta e preservação de amostras de água.
- Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- Norma CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- Norma CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

3 DEFINIÇÕES

3.1 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.2 Clostrídios sulfito-redutores

São bactérias pertencentes ao gênero Clostridium que apresentam a capacidade de reduzir o sulfito. Além de C. perfringens, há muitas outras espécies de clostrídios sulfito-redutores.

3.3 Clostridium perfringens

São bacilos curtos, Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios, imóveis, esporogênicos (esporos ovais, com localização central ou subterminal). Não possuem catalase; fermentam a lactose, manose e sacarose com produção de gás e apresentam fraca fermentação da celobiose, manitol e salicilina, e fermentação turbulenta do leite. Produzem lecitinase, gelatinase e fosfatase ácida; reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o nitrato a nitrito. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento é de 45°C, podendo crescer entre 20 e 50°C.

3.4 DRCM

Meio diferencial enriquecido para clostrídios, no qual as bactérias pesquisadas reduzem o sulfito contido no meio, formando sulfeto, provocando o enegrecimento do meio de cultura.

3.5 Esporos

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

3.6 Leite tornassolado

Os clostrídios sulfito-redutores têm a propriedade de fermentar o leite tornassolado de forma característica, provocando a coagulação do caseinogênio. Durante o processo, a lactose é fermentada com produção de ácido e grande quantidade de gás, o que provoca o rompimento dos coágulos. A produção de ácido é evidenciada pela coloração rosa do indicador de pH (o tornassol).

3.7 Número mais provável (NMP)

É a estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos através da aplicação da técnica de tubos múltiplos.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

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

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato, para utilização na temperatura de 75°C. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para atingir a altura do nível da amostra contida no frasco de coleta, 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

Deve 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-destillada 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 103393 pA (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²), 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 o ar existente na câmara e sua operação completa deve durar, no máximo, uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.4.2 Estufa para esterilização

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

4.1.5 Incubadora bacteriológica termostatizada

Deve manter a temperatura na faixa de 35 ± 0,5°C e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em um local onde a

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. Sua aferição deve ser feita periodicamente.

temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C.²

4.1.6 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. 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 água de diluição

De borossilicato ou com tampa que permite boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas solúveis; para conter 90 ± 2 mL de água de diluição, 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 de plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.4 Pipetas

Devem ser de borossilicato, tipo Mohr, para 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão.

4.2.5 Tubos de ensaio

De borossilicato ou 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 Sistema de anaerobiose

² A verificação da temperatura da incubadora deve ser feita periodicamente (mínimo de duas vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral), colocados em pontos representativos, sendo aconselhável, também, a colocação de um termômetro de máxima e mínima em sua parte central.

4.3.1.1 Jarras de anaerobiose

Devem ser transparentes, feitas de termoplástico rígido e resistente à autoclavagem. Suas tampas devem ser munidas de uma junta de borracha e um sistema de prensão que garantam vedação segura e ter, em sua face inferior, um cesto metálico contendo pastilhas de paládio e alumínio, que irão atuar como catalisadores da reação entre hidrogênio (H_2) e o oxigênio (O_2).³ Para a limpeza das jarras, evitar o uso de qualquer abrasivo, solvente ou detergente; basta lavá-las com água e secar cuidadosamente.

4.3.1.2 Indicador de anaerobiose

É constituído por um envelope contendo uma tira de papel de filtro embebido em uma solução de azul de metileno. Deve ser conservado entre 4°C e 10°C.

4.3.1.3 Sistema gerador de dióxido de carbono (CO_2) e de hidrogênio (H_2)

É utilizado para obtenção de uma atmosfera anaeróbia dentro das jarras. Contém dois comprimidos: um de borohidreto de sódio (gerador de hidrogênio) e outro de bicarbonato e ácido cítrico (gerador de dióxido de carbono).

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 acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.4 Estantes

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

4.3.5 Membrana filtrante

Com 47 mm de diâmetro e 0,2 μ m de porosidade, brancas e estéreis.

4.3.6 Estojo para pipetas

Usar estojos de alumínio ou de aço inoxidável de tamanho adequado para acondicionamento das pipetas a serem esterilizadas.

3 O excesso de umidade ou a ação do sulfeto de hidrogênio pode causar a inativação do catalisador (paládio e alumínio) e sua recuperação pode ser feita através do aquecimento das pastilhas em estufa a 160°C durante duas horas. Após a recuperação, manter essas pastilhas em dessecadores.

Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para a esterilização.

4.3.7 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro ou de aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.3.8 Termômetros

4.3.9 Bomba de vácuo

Ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5 atm.

4.3.10 Frasco Kitassato de paredes espessas

Ou suporte especial para porta-filtro.

4.3.11 Porta-filtro

De vidro, de plástico autoclavável ou de aço inoxidável.

5 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

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 Meio diferencial enriquecido para clostrídios (DRCM), segundo Gibbs e Freame, 1965. Concentração simples.

5.1.1 Fórmula

Peptona.....	10,0 g
Extrato de carne purificado (em pó).....	10,0 g
Acetato de sódio hidratado.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	1,5 g
Amido solúvel.....	1,0 g
Glicose.....	1,0 g
L-cisteína.....	0,5 g
Água destilada.....	1000 mL
pH após esterilização: 7,1 - 7,2	

5.1.2 Preparo

Dissolver a peptona, o extrato de carne purificado, o acetato de

sódio e o extrato de levedura em 800 mL de água destilada (solução A). Com os 200 mL restantes de água destilada, dissolver o amido, inicialmente fazendo uma pasta com um pouco de água fria e, posteriormente, acrescentando o restante de água aquecida, sob agitação. Juntar a solução de amido à solução A e acrescentar finalmente a L-cisteína e a glicose. Aquecer, agitando freqüentemente, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,1 - 7,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave, a 121°C durante 15 minutos.⁴

Nota: No momento da inoculação da amostra, adicionar assepticamente, a cada tubo recentemente aquecido e esfriado, 0,2 mL de uma solução em partes iguais de citrato férrico a 7% e sulfito de sódio a 4%.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente e em local limpo e livre de poeira durante, no máximo, uma semana.

5.2 Meio diferencial enriquecido para clostrídios (DRCM), segundo Gibbs e Freame, 1965. Concentração dupla.

5.2.1 Fórmula

Peptona.....	20,0 g
Extrato de carne purificado (em pó).....	20,0 g
Acetato de sódio hidratado.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Amido solúvel.....	2,0 g
Glicose.....	2,0 g
L-cisteína.....	1,0 g
Água destilada.....	1000 mL
pH após esterilização: 7,1 - 7,2	

5.2.2 Preparo

Dissolver a peptona, o extrato de carne purificado, o acetato de sódio e o extrato de levedura em 800 mL de água destilada (Solução A).

Com os 200 mL restantes de água destilada, dissolver o amido, inicialmente fazendo uma pasta com um pouco da água fria e, posteriormente, acrescentando o restante da água aquecida, sob agitação. Juntar a solução de amido à solução A e acrescentar finalmente a L-cisteína e a glicose. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando

⁴ No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e a esterilização não deve exceder duas horas.

cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,1 - 7,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.⁵

Nota: No momento da inoculação da amostra, adicionar assepticamente, a cada tubo recentemente aquecido e esfriado, 0,4 mL de uma solução em partes iguais de citrato férrico a 7% e sulfito de sódio a 4%.

5.2.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente e em local limpo e livre de poeira durante, no máximo, uma semana.

5.3 Leite tornassolado (Litmus milk)

5.3.1 Fórmula

Leite desnatado.....	100 g
Tornassol (Litmus).....	0,75 g
pH após esterilização: 6,8	

5.3.2 Preparo

Pesar 100 g do meio desidratado "Litmus milk" e acrescentar 1 000 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. Se necessário ajustar o pH para 6,8 com uma solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.⁶

5.3.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente e em local limpo e livre de poeira durante, no máximo, uma semana.

5.4 Água de diluição

5.4.1 Fórmula

Solução estoque A.....	1,25 mL
Solução estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1000 mL

⁵ Ver nota de rodapé 4.

⁶ Ver nota de rodapé 4.

5.4.2 Preparo

- a) Preparar a solução estoque A com a seguinte composição:
- | | |
|---|---------|
| Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a..... | 34 g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000 mL |

Preparo: Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos plásticos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.⁷

- b) Preparar a solução estoque B com a seguinte composição:
- | | |
|--|---------|
| Cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).. | 81,1 g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000 mL |

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos plásticos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

- c) Adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a um litro de água destilada.
- d) Distribuir quantidades que assegurem, após autoclavagem, volumes de 90 ± 2 mL em frascos com tampa de rosca.
- e) Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- f) Armazenar à temperatura ambiente.

5.5 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.5.1 Fórmula

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40 g
Água recém-destilada q.s.p.....	1000 mL

5.5.2 Preparo

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico

⁷ Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez ou presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

e completar o volume para 1000 mL com água recém-destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio. Armazenar em frasco plástico com tampa de rosca.

5.6 Solução de citrato férrico a 7%

5.6.1 Fórmula

Citrato férrico amoniacal verde.....	7 g
Água destilada.....	100 mL

5.6.2 Preparo

Pesar 7 g de citrato férrico e dissolver em 100 mL de água destilada. Esterilizar por filtração através de membrana filtrante com porosidade de 0,2 µm.

5.7 Solução de sulfito de sódio a 4%

5.7.1 Fórmula

Sulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.....	4 g
Água destilada.....	100 mL

5.7.2 Preparo

Pesar 4 g de sulfito de sódio e dissolver em 100 mL de água destilada. Esterilizar por filtração através de membrana filtrante com porosidade de 0,2 µm.

5.7.3 Armazenamento

As soluções de citrato férrico e de sulfito de sódio, distribuídas em frascos rosqueados, são armazenadas em geladeira (temperatura entre 2 e 8°C) durante, no máximo, duas semanas e adicionadas aos meios de cultura (5.1 e 5.2), no momento da semeadura da amostra.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Princípio do método

A determinação do número mais provável (NMP) de Clostridium perfringens em uma amostra é efetuada a partir da aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas, uniformemente distribuídas na amostra. 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 sementeira fornece resultados negativos em, pelo menos, um tubo da série em que foram inoculados. A combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade das bactérias pesquisadas através da aplicação de cálculos de probabilidade. Para análises de águas, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, usando-se séries de cinco tubos para cada volume a ser inoculado.

6.2 Etapas do método

6.2.1 Ensaio presuntivo

Consiste na sementeira de volumes determinados da amostra em séries de cinco tubos contendo o meio diferencial enriquecido para clostrídios (DRCM), que são incubados em anaerobiose a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. O enegrecimento do meio de cultura é uma prova presuntiva positiva para a presença de Clostridium perfringens.

6.2.2 Ensaio confirmativo

Consiste na transferência de cada cultura dos tubos de meio diferencial enriquecido para clostrídios com resultado presuntivo positivo para um tubo correspondente contendo o meio de leite tornassolado, os quais são incubados em anaerobiose a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. A formação de coágulos, rompidos pela grande quantidade de gás formada, e a acidificação do meio constituem uma prova confirmativa positiva para a presença de Clostridium perfringens.

6.3 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de coleta e preservação de amostras de água, da CETESB, 1988.

6.3.1 Amostra

6.3.2 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre ela devem ser completas (número da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.3.3 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 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 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 tiosulfato é requerida. Nesses casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

6.3.4 Agentes quelantes: para a coleta 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 coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA (pH final = 6,5), para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato 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 tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

6.3.5 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a coleta e o 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.

6.4 Procedimento

6.4.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os seus volumes a serem inoculados, em função de sua procedência, segundo especificado a seguir:

- a) para águas de consumo humano é recomendada preferencialmente a inoculação de dez porções de 10 mL, para totalizar 100 mL da amostra, podendo ser analisadas também cinco porções de 10 mL.
- b) para outros tipos de água, a técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, sendo cada volume inoculado em uma série de cinco tubos. A seleção desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de C. perfringens presentes na amostra ou em dados prévios sobre ela), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado com o menor volume selecionado forneça resultado

negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável para amostras desconhecidas a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.

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

6.4.3 Preparação da amostra para inoculação

Aquecer as amostras em banho-maria a 75°C durante 10 minutos, para eliminação de organismos não esporulados e formas vegetativas.

6.4.4 Calcular o número de tubos de DRCM a serem utilizados e aquecê-los em água fervente durante, aproximadamente, 10 minutos para remover todo o ar neles existente e esfriá-los rapidamente em água fria, antes do uso.

6.4.5 Realizar o ensaio presuntivo, conforme especificado em 6.4.6 a 6.4.19.

6.4.6 Preparar os tubos de DRCM requeridos para o ensaio, conforme definido em 6.4.1, e dispô-los em estantes, em fileiras de cinco tubos.

Nota: Usar o meio DRCM em concentração dupla para inoculação das porções de 10 mL da amostra e, em concentração simples, para os demais volumes.

6.4.7 Preparar uma solução com 50% de citrato férrico a 7% e 50% de sulfito de sódio a 4% e, com uma pipeta estéril de 1 mL, adicionar assepticamente 0,4 mL desta solução a cada um dos tubos contendo DRCM em concentração dupla e 0,2 mL a cada tubo contendo DRCM em concentração simples.

6.4.8 Proceder à identificação dos tubos anotando no primeiro tubo à direita na primeira fileira o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado em cada um dos seus tubos.

6.4.9 Homogeneizar a amostra lentamente, para evitar sua oxigenação.⁸

6.4.10 Com uma pipeta esterilizada de 10 mL, e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição, antecipadamente

⁸ Todos os procedimentos, que envolvem homogeneização e transferência de volumes da amostra, devem ser efetuados lentamente, para evitar aeração e, conseqüentemente, a sua oxigenação.

identificado. Prepara-se, assim, a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL corresponde a 0,1 mL da amostra (ver Figura 1).

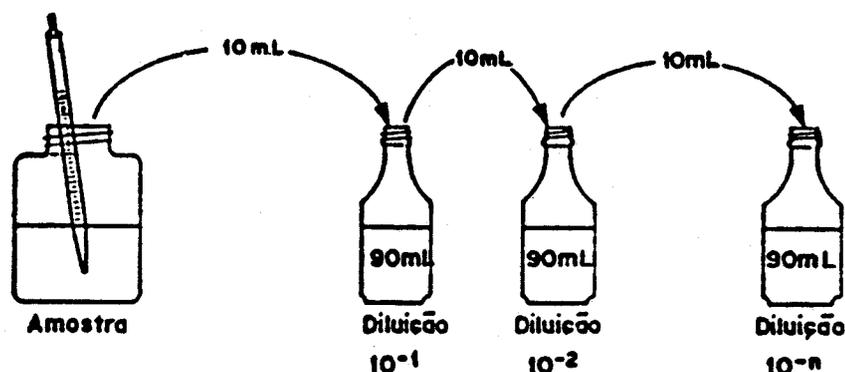


FIGURA 1 - Preparo das diluições decimais

6.4.11 Com a mesma pipeta, semear 10 mL da amostra em cada um dos tubos com DRCM em concentração dupla, quando este volume for requerido para o teste (ver Figura 2).

6.4.12 Desprezar a pipeta de 10 mL e, com uma pipeta de 5 mL, inocular 1 mL da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo.

6.4.13 Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição (10^{-1}) como em 6.4.9 e, com uma nova pipeta esterilizada, transferir 10 mL para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição, conseguindo-se assim, a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL corresponde a 0,01 mL da amostra.⁹

6.4.14 Proceder dessa maneira na seqüência de diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ... 10^{-n}).

Nota: A Figura 1 sintetiza o procedimento relativo ao preparo das diluições decimais seriadas.

6.4.15 Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo seqüência decrescente (da maior para a menor diluição efetuada).

6.4.16 Proceder como em 6.4.9, com o frasco contendo a última diluição efetuada e, com uma pipeta estéril de 5 mL, inocular 1 mL da diluição em cada um dos tubos com DRCM em concentração simples correspondentes a essa diluição.

⁹ Essas transferências devem ser efetuadas cuidadosamente, depositando-se o inóculo da amostra diretamente na água de diluição, para evitar aeração.

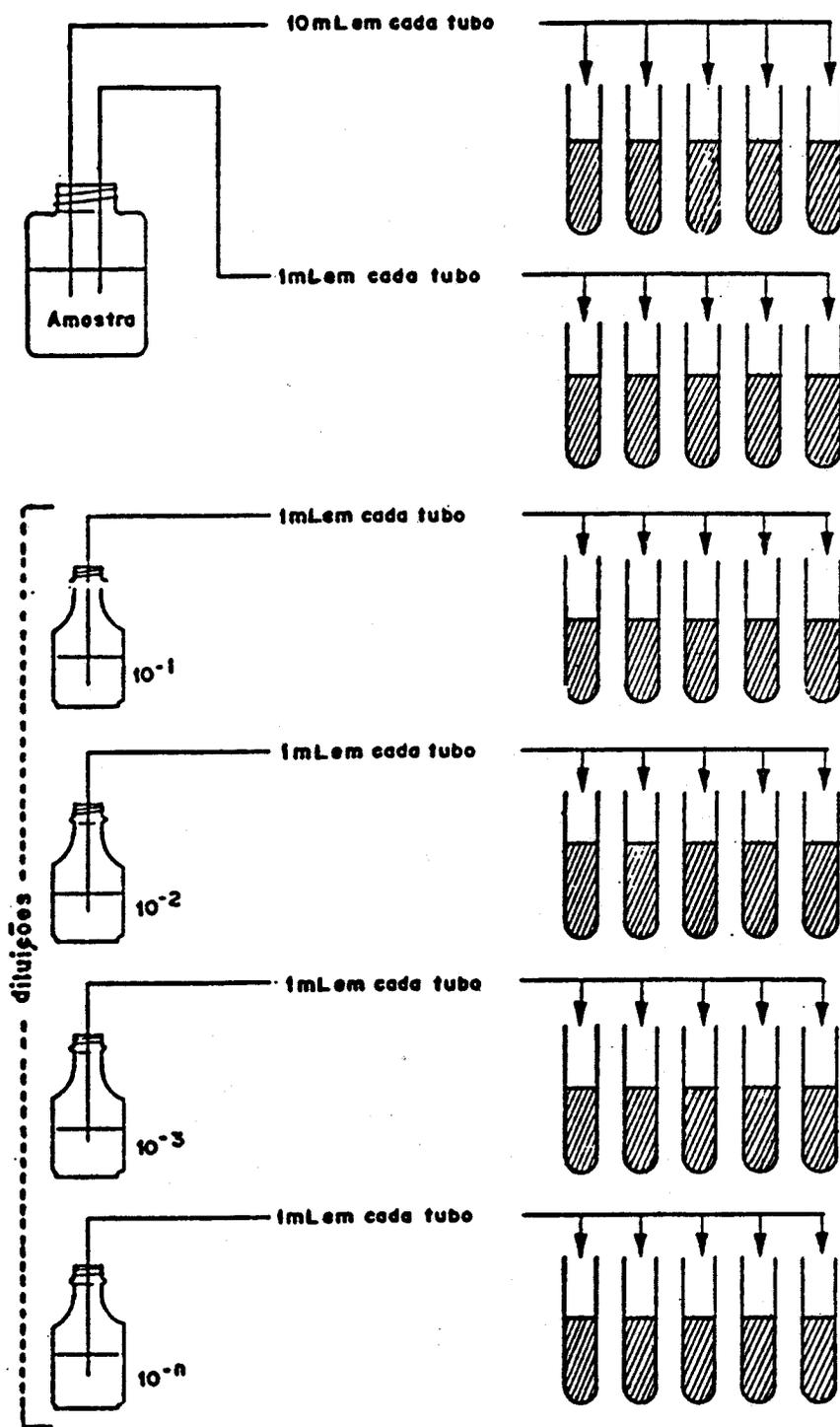


FIGURA 2 - Ensaio presuntivo - Inoculação dos volumes da amostra e suas diluições decimais

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

Nota: A Figura 2 sintetiza o procedimento relativo à inoculação dos volumes da amostra e das suas diluições decimais.

6.4.18 Colocar os tubos inoculados dentro da jarra de anaerobiose; em seguida, o sistema gerador de hidrogênio e dióxido de carbono e o indicador de anaerobiose, procedendo da seguinte maneira:

6.4.18.1 Cortar a extremidade demarcada de cada envelope gerador de hidrogênio e dióxido de carbono e, em posição vertical, colocar três envelopes em cada jarra.

6.4.18.2 Afastar as bordas do envelope e, com uma pipeta, introduzir 10 mL de água pela abertura de cada um deles.¹⁰

6.4.18.3 Abrir a metade do envelope do sistema indicador¹¹ e colocá-lo de maneira que fique bem visível na jarra. O indicador é usado para controle de anaerobiose e, caso permaneça azul, indica falhas de vedação da jarra ou de não funcionamento do catalisador.

6.4.18.4 Após a colocação dos sistemas gerador e indicador de anaerobiose, tampar imediatamente a jarra, tendo o cuidado de rosquear bem o parafuso da tampa.

6.4.18.5 Esperar durante alguns minutos e verificar se ocorreu a reação entre o hidrogênio liberado pelo sistema gerador e o oxigênio presente na jarra. Isto é observado através da condensação nas paredes da jarra do vapor de água formado e do aquecimento devido à liberação de calor durante a reação.

6.4.19 Incubar a jarra contendo as placas à temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

6.4.20 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura considerando resultado presuntivo positivo para os tubos que apresentarem enegrecimento do meio de cultura. Todos os tubos com resultado positivo devem ser submetidos à confirmação e os restantes, descartados. Os tubos em que se observar densa turvação do meio de cultura são considerados como resultados duvidosos, devendo também ser submetidos à confirmação.

10 Por adição de água ao envelope, há o desprendimento de hidrogênio (H_2) pelo boroidreto de sódio, e o desprendimento de dióxido de carbono (CO_2) pela reação entre o bicarbonato de sódio e o ácido cítrico. Na presença do catalisador (paládio e alumínio), o hidrogênio reage com o oxigênio do ar presente na jarra formando água; dessa forma, obtém-se uma atmosfera anaeróbia. O dióxido de carbono liberado favorece a multiplicação de certos organismos que seriam inibidos ou se desenvolveriam mal na ausência deste gás.

11 O indicador utilizado é o azul de metileno que, na ausência de oxigênio, assume a forma reduzida incolor e, na presença de oxigênio, a forma oxidada, azul.

6.4.21 O ensaio confirmativo é efetuado utilizando-se o leite tornassolado, procedendo-se da seguinte forma:

6.4.21.1 Calcular o número de tubos do meio leite tornassolado a serem utilizados e aquecê-los em um béquer com água fervente durante, aproximadamente, 5 minutos, para remover todo o ar neles existente e resfriá-los rapidamente em água fria, antes do uso.

Nota: O nível de água contido no béquer deverá estar no mesmo nível do meio contido nos tubos.

6.4.21.2 Identificar todos os tubos de leite tornassolado, correspondentes respectivamente a cada tubo positivo de DRCM.

6.4.21.3 Com o auxílio de uma pipeta estéril, coletar um inóculo de 0,1 mL da cultura positiva de cada tubo de DRCM, tomando cuidado para que esse inóculo seja coletado do fundo do tubo.

6.4.21.4 Transferir esse inóculo para o tubo contendo o meio leite tornassolado correspondente, efetuando essas inoculações em profundidade.

6.4.21.5 Colocar os tubos inoculados dentro da jarra de anaerobiose, procedendo como em 6.4.18.

6.4.22 Incubar as jarras contendo os tubos inoculados à temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

6.4.23 Efetuar a leitura, considerando positivos todos os tubos que apresentarem concomitantemente as seguintes características:

- formação de coágulos (decorrente da coagulação do caseinogênio do leite);
- acidificação (evidenciada pela coloração rosa do meio de cultura);
- formação de grande quantidade de gás, causando rompimento dos coágulos (fermentação turbulenta do leite).

6.4.24 Com os dados obtidos, calcular o NMP de Clostridium perfringens em 100 mL da amostra.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo do número mais provável (NMP/100 mL)

7.1.1 A densidade é expressa como número mais provável (NMP) de Clostridium perfringens por 100 mL.

7.1.2 A Tabela 1 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculados cinco porções de 10 mL da amostra.

TABELA 1 - Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas cinco porções de 10 mL da amostra

Número de tubos com reação positiva, a partir de cinco tubos de 10 mL	Índice de NMP/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

7.1.3 A Tabela 2 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas dez porções de 10 mL da amostra.

TABELA 2 - Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas dez porções de 10 mL da amostra

Número de tubos com reação positiva, a partir de dez tubos de 10 mL	Índice de NMP/100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	> 23,0	13,5	Infinito

7.1.4 A Tabela 3 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas cinco porções de 10 mL, cinco porções de 1 mL e cinco porções de 0,1 mL da amostra. Embora os volumes indicados se refiram mais especificamente a amostras de águas pouco poluídas, essa Tabela também pode ser utilizada quando são inoculados volumes maiores ou menores da amostra. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de clostrídios sulfito redutores (Clostridium perfringens), o código é composto a partir de tubos com resultado positivo no meio leite tornassolado.

7.1.5 Utilização da Tabela 3

7.1.5.1 Quando são inoculadas apenas três séries de cinco tubos, sendo utilizados os volumes indicados na Tabela (10 mL, 1 mL e 0,1 mL): neste caso, o NMP é obtido diretamente a partir da Tabela 3. Para isto, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente. Exemplos: ver Tabela 4.

7.1.5.2 Quando são inoculadas apenas três séries de cinco tubos, sendo utilizados volumes decimais diferentes daqueles indicados na Tabela 3: neste caso, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas verificando-se o valor do NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

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

Exemplos: ver Tabela 5.

7.1.5.3 Quando mais de três volumes decimais são inoculados: neste caso, para a composição do código são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a três 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 apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontrando-se o código na Tabela e o NMP a ele correspondente, o valor final do NMP é obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado sele-} \\ \text{cionado para compor o código}}$$

Exemplos: ver Tabela 6.

TABELA 3 - Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL em séries de cinco tubos

Número de tubos com reação positiva quando são utilizados, em série de cinco tubos, de:			Índice de NMP/100 mL	Limites de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	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	-	-

7.1.5.4 Casos especiais

- a) se menos que três das diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, para a composição do código são selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver Exemplo 1 da Tabela 7);
- 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 número de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver Exemplo 2 da Tabela 7);
- c) embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores àqueles selecionados para a formação do código, se isso ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultado positivo nos cinco tubos, seguido do número de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver Exemplo 3 da Tabela 7);
- d) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar, para a composição do código, as três maiores diluições (ver Exemplo 4 da Tabela 7);
- e) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar, para a formação do código, as três menores diluições (ver Exemplo 5 da Tabela 7).

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 Os resultados são expressos como:

NMP/100 mL de Clostridium perfringens.

/TABELAS 4,5 e 6

TABELA 4 - Exemplos

Exemplos	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:			Código (Combinado 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

TABELA 5 - Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:							Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	100 mL	10 mL	1(10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL				
100-10-1	5	4	0					540	130	$130 \times \frac{10}{100}$	13
10 ⁰ a 10 ⁻²			5	0	0			500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 ⁻¹ a 10 ⁻³				4	1	0		410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 ⁻² a 10 ⁻⁴					3	0	0	300	8	$8 \times \frac{10}{0,01}$	8000

TABELA 6 - Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:								Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	10 ⁰ mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL	10 ⁻⁶ mL				
10 a 10 ⁻²	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	-	-	-	-	531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	$1,1 \times 10^3$
10 ⁰ a 10 ⁻⁴	-	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	-	-	521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	$7,0 \times 10^3$
10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	-	-	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	-	520	50	$50 \times \frac{10}{0,001}$	$5,0 \times 10^5$
10 ⁻² a 10 ⁻⁶	-	-	-	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	$2,3 \times 10^5$

Obs: Números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

/TABELA 7

TABELA 7 - Exemplos

Exemplos	Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
		10 mL	1(10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL				
1	10 ⁰ - 10 ⁻³	///	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	///	///	410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	170
2	10 ⁰ - 10 ⁻⁵	///	5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	$2,2 \times 10^4$
3	10 ¹ - 10 ⁻⁴	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	0	///	540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	$1,3 \times 10^3$
4	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁵	///	///	5	5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	555	> 1600	$> 1600 \times \frac{10}{0,001}$	$> 1,6 \times 10^7$
5	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁵			<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	000	< 2	$< 2 \times \frac{10}{1}$	< 200

/ANEXO A

ANEXO A - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

A-1 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma Técnica CETESB Mi.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia.

A-2 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 no crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade através da realização de testes específicos. Ver Norma Técnica CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

A-3 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meios de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens, em local fresco e seco, protegidos da luz. Em laboratórios não equipados com ar condicionado, o armazenamento dos meios desidratados deve ser efetuado colocando-se os frascos de boca para baixo; isso produz um efeito de selagem conveniente ao redor da tampa de rosca, que retardará a decomposição do meio.

A-4 Cuidados no preparo dos meios de cultura

Quando forem usados meios desidratados, eles deverão estar inalterados quanto à cor, odor, consistência e, principalmente, não se apresentar endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes para que não liberem substâncias, tais como cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

A-5 Controle de qualidade de meios de cultura

No preparo dos meios de cultura, vários cuidados devem ser observados. Ver Norma Técnica CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

A-6 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa que contém os meios de cultura a serem esterilizados. Essas

ampolas, depois da autoclavagem, são incubadas em banho-maria a 55 °C, durante 24-48 horas. Se houver mudança de coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isso significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-7 Método alternativo para estabelecimento de atmosfera anaeróbia em jarras

Remover o ar contido na jarra estabelecendo vácuo e introduzir uma mistura de gases (80-90% de nitrogênio, 5-10% de hidrogênio e 5-10% de dióxido de carbono). O hidrogênio é utilizado para, frente ao catalisador, combinar-se com possíveis resíduos de oxigênio. Deve-se usar um indicador para controle das condições de anaerobiose.

A-8 Precauções

Todas as operações mencionadas com as jarras, relativas à obtenção de uma atmosfera anaeróbia em seu interior, devem ser efetuadas longe de qualquer chama, pois o hidrogênio liberado é suscetível de se inflamar.

A-9 Técnica de tubos múltiplos - Avaliação dos resultados

Os diferentes códigos correspondentes às combinações de resultados positivos e negativos, empregados para o cálculo de 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 Técnica CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água.

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, p. 9-1 a 9-132.
- B-2 BEERENS, H., TAHON-CASTEL, M.M. & BARON, G. Milieu de sporulation pour Clostridium perfringens. Ann. Inst. Pasteur - Lille, 20: 163-166, 1969.
- B-3 BISSON, J.W. & CABELLI, V.J. Membrane filter enumeration for Clostridium perfringens. Appl. and Environ. Microbiol., 37: 55-66, 1979.
- B-4 BISSON, J.W. & CABELLI, V.J. Clostridium perfringens as a water pollution indicator. J. Wat. Pollut. Control. Fed., 52(2): 241-248, 1980.
- B-5 BLAZEVIC, D.J. & EDERER, G.M. Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York, John Wiley & Sons, 1975, 136 p.
- B-6 BOND, G.J. Bacteriological methods for estimation of water pollution. Health Laboratory Science, 3: 124-128, 1966.
- B-7 BUTTIAUX, R. L'analyse bacteriologique des eaux de consommation. Collection de L'Institut Pasteur Ed. Medicales Flammarion, 1951.
- B-8 CABELLI, V.J. Clostridium perfringens as a water quality indicator. In: HOADLEY, A.W. & DUTKA, B.J.(ed). Bacterial indicators/health hazards associated with water. Philadelphia. American Society for Testing and Materials, 1977. p.65-79.
- B-9 CETESB. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- B-10 _____. Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, 1988.
- B-11 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1ª revisão).
- B-12 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).

-
- B-13 DEHYDRATED CULTURE MEDIA: guide for selection of culture media. In: Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratories procedures. 10 ed. Michigan, Difco Laboratories, 1985.
- B-14 MANUAL OF CULTURE MEDIA, ingredients and other laboratory services, 5 ed. London, Oxoid Limited, 1982.
- B-15 MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE E DA LA POPULATION. Recueil des textes officiels Fascicule special no 62 - 31, France, 1958.
- B-16 SARTORY, D.P. Faecal clostridia and indicator bacteria levels in an eutrophic impoundment. *Wat.SA*, 14: 115-117, 1988.
- B-17 SNEATH, P.H.A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Genus Clostridium Prazmowski 1880 - 23^{al}. In: SNEATH, P.H.A et alii(ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, 2:sec 13, p. 1141-1200.
- B-18 SORENSEN, D.L., EBERL, S.G. & DICKSA, R.A. Clostridium perfringens as a point source indicator in non-point polluted streams. *Wat. Res.*, 23 (2): 191-197, 1989.
- B-19 THE BACTERIOLOGICAL EXAMINATION OF WATER SUPPLIES. Reports on Public Health and Medical Subjects, 71: 32-33. Her Majesty's Stationary Office, London, 1969.
-