

SINAJANA MOREIRA RIBAS

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE ÁGUAS DE DIFERENTES ORIGENS DA
REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, UTILIZANDO A TÉCNICA DOS
TUBOS MÚLTIPLOS E A TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE**

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná,
referente ao Estágio Em Patologia Básica
– Área de Microbiologia, como requisito
para obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Co-orientador: Carlos Roberto Dalke

CURITIBA

1997

“O mestre na arte da vida
faz pouca distinção entre
seu trabalho e seu lazer,
sua mente e seu corpo,
sua educação e sua recreação,
seu amor e sua religião.
Ele dificilmente sabe
distinguir um do outro.
Ele simplesmente persegue
sua visão de excelência
em tudo o que faz,
deixando aos outros
a decisão se ele está
trabalhando ou se divertindo.
Ele está sempre fazendo ambos simultaneamente.”

Texto Zen Budista

Agradecimentos

À professora *Ida Chapaval Wimentel* pela orientação, ensino, apoio e incentivo na realização deste trabalho; pela sua grande amizade e pela alegria e bom-humor constantes.

Ao pesquisador *Carlos Roberto Dalke* pela orientação e ajuda prestadas neste trabalho e à sua equipe da *Sanepar*, que contribuíram para a realização do mesmo.

Ao professor *Juarez Gabardo* pelo auxílio nos cálculos e análises estatísticas.

À professora *Maria Elisa Giacomazzi Ribas* pela sua amizade, apoio, incentivo e compreensão.

Ao professor *Manoel Carlos Toth Quintilham* pela grande amizade e pela relação de "paizão" que sempre teve com seus alunos. Por mostrar que uma sala de aula é muito mais que apenas um professor despejando conteúdos e alunos anotando nos cadernos.

A todos aqueles professores do *Curso de Ciências Biológicas*, que de alguma maneira contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À bióloga, secretária e amiga *Rosane Cavet Martins* pela amizade, pelas ajudas prestadas e também pela paciência cada vez que lhe era pedido para usar o computador da *Coordenação* para fazer um dos inúmeros trabalhos do *Curso*.

Ao fotógrafo *Sideval Ruppel* pela realização da maioria das fotos que se encontram neste trabalho.

À funcionária *Clotilde Sadas* pela preparação dos meios de cultura e esterilização dos materiais utilizados nos experimentos.

Aos monitores *Evandro Reis de Souza* e *Paulo Henrique Zaramela* pelas ajudas com o computador e por ficarem várias vezes um pouco além do horário com a sala de computadores aberta para que eu pudesse terminar algum trabalho.

Ao grande amigo Agnaldo de Oliveira, pela sua enorme paciência em ensinar algumas dicas e responder minhas dúvidas no uso do computador, e por ter ajudado inúmeras vezes na realização de alguns trabalhos.

Aos grandes amigos e colegas de curso Cláudia Regina Rosa e Carlos Alberto Miqueloto, pela amizade, companhia, trabalhos realizados em conjunto, pelas "caronas", piadas e brincadeiras.

As minhas grandes amigas Carolina Bittencourt Reis e Simone Beatriz Vede, pela grande e sólida amizade de longos anos.

A alguns colegas de Curso em especial: Kelly Cristiany Gutseit e César Bolívar Daniel; Carolina Lomando Cañete e Leonardo Morissy Hostin; Luciana Chaves de Mello; Joice Maria da Cunha; Guilherme Schnell e Schulli e às "trigêmeas" Carolina Aimoré Bonin, Fernanda Stender de Oliveira e Adriane Martins de Freitas. A todos esses pela convivência mais próxima e maior afinidade existente ao longo do curso.

A todos os outros amigos(as), colegas de faculdade ou não, que de alguma forma fizeram, fazem e espero que continuem fazendo parte da minha vida.

Um agradecimento em especial a Deus pela criação da natureza, o grande instrumento e campo de trabalho/preservação do Biólogo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	06
2.1. Obtenção das amostras.....	06
2.2. Meios de Cultura.....	06
2.2.1. Caldo Lactosado.....	06
2.2.2. Caldo Lactosado Verde Bile Brillante.....	06
2.2.3. Caldo EC.....	07
2.2.4. M-Endo Broth.....	07
2.2.5. M-FC Broth.....	07
2.3. Preparação de material.....	08
2.4. Técnica dos Tubos Múltiplos.....	08
2.4.1. Determinação de Coliformes Totais.....	08
2.4.2. Determinação de Coliformes Fecais.....	09
2.5. Técnica da Membrana Filtrante.....	09
2.5.1. Determinação de Coliformes Totais.....	09
2.5.2. Determinação de Coliformes Fecais.....	09
2.6. Análise dos resultados.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. CONCLUSÃO.....	20
5. ANEXOS.....	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

Foram estipuladas seis amostras de águas, de diferentes origens, para serem submetidas à análises bacteriológicas por meio de duas técnicas (técnica dos Tubos Múltiplos e técnica da Membrana Filtrante) com o objetivo de detectar presença ou ausência de bactérias do grupo coliforme, indicadoras de poluição fecal, para verificar a qualidade da água. Foram analisadas duas águas de poço, duas águas minerais e duas águas de rio. Para cada amostra foram feitas três repetições pela técnica dos Tubos Múltiplos e cinco repetições pela técnica da Membrana Filtrante. Na técnica dos Tubos Múltiplos utilizou-se os meios de Caldo Lactosado, Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante (detecção de coliformes totais) e Caldo EC (detecção de coliformes fecais) para cada repetição, enquanto que na técnica da Membrana Filtrante os meios utilizados foram o M-Endo Broth e o M-FC Broth para coliformes totais e fecais, respectivamente. Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação e os dados obtidos foram submetidos à análises estatísticas.

1. INTRODUÇÃO

A água funciona como um veículo para transmissão de diversas doenças causadas por microrganismos. A microbiologia sanitária ocupa-se do controle desse problema analisando as patologias resultantes da contaminação fecal. Estas doenças são resultantes de ingestão de água contaminada ou do emprego inadequado de água poluída (ROITMAN *et al.*, 1988). A vigilância rotineira da qualidade bacteriológica da água é indispensável, tendo em vista a necessidade de proteger a saúde dos consumidores. Devido a isso é necessário realizar exames periódicos dessas águas, para determinar seu grau de segurança do ponto de vista bacteriológico (CETESB, 1984).

Água segura é essencial para a boa saúde do ser humano. A contaminação de água com material fecal é comum em áreas com condições de higiene e saneamento precárias, por isso a determinação da qualidade microbiológica da água é essencial. Testes de rotina simples da qualidade bacteriológica de água de beber são feitos para detectar a presença de coliformes (LUKSAMIJARULKUL *et al.*, 1994).

Os métodos microbiológicos têm sido grandemente utilizados no controle da contaminação fecal e na detecção de microrganismos patogênicos na água. Os níveis de contaminação toleráveis e os padrões sanitários de qualidade da água são estabelecidos em função do uso a que se destina (ROITMAN *et al.*, 1988).

Vários tipos de bactérias patogênicas podem ser encontradas na água. Para a avaliação das condições sanitárias de uma água são utilizadas bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de poluição fecal, pois estão sempre presentes no trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, sendo eliminadas em grandes quantidades pelas fezes. A presença de coliformes na água indica poluição e sua ausência é indicativo de uma água bacteriologicamente potável, visto que são mais resistentes nesse ambiente que as bactérias patogênicas de origem intestinal (CETESB, 1984).

O grupo coliforme inclui todos os bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície com propriedades similares de inibição de crescimento e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás à 35 °C em 24 - 48 horas. Quanto às técnicas de detecção, considera-se do grupo Coliforme aqueles organismos que na técnica dos Tubos Múltiplos (ensaios presuntivo e confirmativo)

fermentam a lactose, com produção de gás, à 35 °C; no caso da Técnica da Membrana Filtrante, aqueles que produzem colônias escuras, com brilho metálico à 35 °C, em meios de cultura do tipo Endo, no prazo máximo de 24 horas. (PORTARIA N° 36).

Essa definição inclui espécies de enterobactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (coliformes totais), que são organismos típicos da microflora fecal podendo, a maioria deles, ser encontrada em outros locais (ROITMAN *et al.*, 1988). Além destes quatro gêneros, outros dois, *Hafnia* e *Serratia*, foram citados por FARMER, 1985.

Uma vez que o grupo dos coliformes totais é composto de gêneros que não são exclusivamente de origem fecal, a sua aplicação como indicador específico de contaminação fecal fica limitada. Esse fato levou ao desenvolvimento de métodos de enumeração de um subgrupo de coliformes denominados coliformes fecais, que se diferenciam dos totais pela sua capacidade de fermentar a lactose em $24 \text{ h} \pm 2\text{h}$, numa temperatura de $44,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ (coliformes termotolerantes). Mas, apesar de a utilização dos coliformes fecais ter determinado uma melhoria na detecção de contaminação, evidenciou-se a presença de coliformes termotolerantes que, por não terem origem exclusivamente fecal, comprometem a especificidade desse subgrupo como indicativo de poluição. Conseqüentemente as análises se restringem à detecção específica de *Escherichia coli*, que é o único componente do grupo coliforme considerado de origem exclusivamente fecal (CETESB, 1984).

A metodologia padrão utilizada no exame bacteriológico da água, para quantificação do grupo coliforme, inclui dois procedimentos: a Técnica dos Tubos Múltiplos e a Técnica da Membrana Filtrante (ROITMAN *et al.*, 1988).

Na Técnica dos Tubos Múltiplos, que abrange prova presuntiva, prova confirmativa e prova completa (PELCZAR *et al.*, 1981), volumes e diluições da amostra de água são inoculados em meio de Caldo Lactosado, em séries de 5 tubos, e incubados à $35 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para verificação posterior dos tubos positivos para produção de gás e para o cálculo do NMP (ROITMAN *et al.*, 1988). O NMP (número mais provável) representa a quantidade mais provável de coliformes existentes em 100ml de água da amostra (CETESB, 1984).

Na Técnica da Membrana Filtrante, volumes e diluições da amostra são passados através de um filtro tipo Millipore, que retém os microrganismos. Estes filtros são colocados sobre meios de cultura seletivos, com ágar, contidos em placas de Petri.

A determinação do número de coliformes é realizada através da contagem de colônias típicas que crescem na superfície da membrana (ROITMAN *et al.*, 1988).

Num estudo feito por EMILIANI & SUNE (1990), variações no número mais provável (NMP) de coliformes fecais durante 1980 e 1988, foram associados com o tempo decorrido entre dia de amostragem/dia chuvoso e com o nível de água do Rio Salado, Argentina, sendo que o menor NMP ocorreu quando um dos dois fatores abióticos foi mais elevado.

Noventa e cinco amostras de água de beber e setenta e cinco amostras de água tratada em recipientes foram coletadas, com técnicas estéreis, para determinação de contaminação de coliformes pela Técnica do Número Mais Provável (NMP). Os resultados revelaram que a taxa de contaminação de coliformes na água de beber foi de 64,21 %; a água de chuva teve a maior contaminação (80,00 %); na água de torneira a contaminação foi de 64,41 %, enquanto que água corrente teve a menor contaminação (5,88 %). A taxa de contaminação das águas utilizadas foi de 38,67 % para coliformes (LUKSAMIJARULKUL *et al.*, 1994).

MOREIRA *et al.* (1994) realizaram um estudo em que foi avaliada água mineral não-carbonatada engarrafada em PVC contendo a flora indígena, água mineral estéril engarrafada em PVC, água mineral estéril em recipientes de vidro e água de torneira em recipientes de vidro, e constataram que *Escherichia coli* tem uma alta taxa de mortalidade sob as condições testadas.

Diferentes métodos de cultura e isolamento de coliformes, sob várias condições de incubação e diferentes meios, foram avaliados em água de beber por PAPANETROPOULOU & PAGONOPOULOU (1995). Os resultados demonstraram que o método do Número Mais Provável (NMP) é menos eficiente (aproximadamente 10 %) na detecção de coliformes totais se comparado à técnica da Membrana Filtrante.

Segundo MUNUERA *et al.* (1994), um decréscimo na qualidade do sistema de distribuição de água de Sevilha tem acontecido como uma consequência da seca sofrida no Oeste da Andalusia. Devido ao alto crescimento no consumo de água engarrafada, uma grande quantidade de marcas registradas, não comercializadas nessa cidade antes, tem aparecido no comércio. Por esta razão, uma amostragem em 62 marcas foi feita, analisando 158 garrafas em sequência para conhecer sua qualidade microbiológica. Como resultados foram encontradas 35 amostras (22,15 %) com valores entre 0-100 UFC/ml; 31 amostras

(19,62 %) entre 100-1000 UFC/ml; 17 amostras (10,75 %) entre 1000-3000 UFC/ml e 75 amostras (47,47 %) acima de 3000 UFC/ml, sendo bactérias aeróbias mesófilas. Coliformes totais foram isolados em três amostras e coliformes fecais em duas.

Dois meios usados para detectar coliformes fecais em água pela filtração em membrana, M-FC e M-TEC, foram modificados e suplementados com um substrato cromogênico e depois comparados para recuperação quantitativa de *Escherichia coli*. Dados de testes em 181 amostras de águas de esgotos, rios, lagos e poços não demonstraram nenhuma diferença estatística significativa na enumeração de *E. coli* com estes meios. Este estudo demonstrou que meios modificados podem ser usados sucessivamente para detecção de *E. coli* em várias águas não-tratadas dentro de 24 horas (CIEBIN *et al.*, 1995).

RAMTEKE *et al.* (1994) testaram 1394 amostras de água, incluindo águas de solo, de superfície e de suprimentos bombeados, para comparar o teste Presença-Ausência (PA) com o método padrão do NMP para detectar coliformes como indicadores da qualidade da água. Das 1394 amostras, 1074 (77,04 %) foram positivas pelo método do NMP e 1030 (74,88 %) foram positivas pelo teste PA.

Um novo meio, C-EC-ágar, foi avaliado por JERMINI *et al.* (1994) para a enumeração simultânea pela filtração em membrana de coliformes fecais e *E. coli* em água. O meio é uma modificação do M-coliforme fecal ágar, do qual a anilina azul e a lactose foram omitidos e outras substâncias foram adicionadas.

RAMTEKE (1995) comparou o método do NMP com três testes microbiológicos simples: teste da tira de papel H-2S, teste Presença-Ausência (PA) para coliformes utilizando MacConkey Broth (PA-TC) e um teste para coliforme fecal utilizando KF-Broth (PA-FS). Neste experimento foram utilizadas 187 amostras de água de três localidades diferentes. Nos testes PA-FS e H-2S foi encontrada maior sensibilidade na detecção de coliformes indicadores e 458 culturas obtidas de testes positivos foram identificadas para avaliar a especificidade dos testes utilizados. A baixa incidência de recuperação de *E. coli* (16-34 %) pelo método NMP gerou dúvida na validade desta aplicação em áreas tropicais e, de acordo com os dados obtidos, aparentemente a combinação do teste PA-FS com o teste H-2S pode ser usada como um teste múltiplo adequado para avaliar a qualidade microbiológica da água em países tropicais.

Um método rápido para enumeração simultânea de coliformes totais e fecais em

amostras de água, em 24 horas e sem a necessidade de testes confirmatórios, foi aprimorado por GALE & BROBERG (1993). A habilidade deste método para enumeração de coliformes em amostras de água foi comparado com o método padrão NMP, que requer 96 horas para confirmação completa. Análises estatísticas demonstraram que o método é menos eficiente na detecção de *Escherichia coli* comparado ao método padrão. Nenhuma diferença significativa estatisticamente foi detectada entre os dois métodos de enumeração para coliformes totais.

Um novo procedimento para confirmação de coliformes totais e fecais do teste presuntivo do NMP foi descrito por GIAMMANCO *et al.* (1992). O procedimento utilizou aparatos de teste enzimático composto de um par de aparelhos. Os resultados obtidos demonstraram que o procedimento é sensível, específico e acurado. Além disso existem algumas vantagens do ponto de vista prático: o custo dos aparelhos é relativamente baixo; seu uso é extremamente simples e consome um curto espaço de tempo; um único aparelho termostático, ajustado à 36 °C para incubação, é necessário; os resultados podem ser obtidos após 18 horas sem nenhum equipamento para leitura e não são submetidos à interpretações subjetivas.

SARTORY & HOWARD (1992) desenvolveram um meio para enumeração de coliformes de água potável pela modificação do meio padrão para filtração em membrana. O meio, Membrane-Lactose Glucuronide Agar (M-LGA), emprega um substrato cromogênico para detecção de atividade enzimática e piruvato de sódio para aumentar a recuperação de coliformes estressados. A identificação de *Escherichia coli* foi significativamente melhorada sobre o M-LGA, com 98,6 % de confirmação dos isolados presuntivos. A recuperação de coliformes das amostras de água também foram significativamente melhores.

Um experimento foi feito para avaliar a eficiência do meio BCFL para detecção de coliformes fecais e não-fecais em 10 horas. Foi observado que o meio BCFL pode ser usado para isolamento rápido de coliformes sob iguais condições de campo (37 °C) com maior eficiência do que com o meio convencional (NMP) (TAK *et al.*, 1992).

Devido a tantos métodos utilizados citados anteriormente, este trabalho teve como objetivos analisar amostras de águas de diferentes origens através de duas técnicas (Tubos Múltiplos e Membrana Filtrante), para detectar presença ou ausência de bactérias do grupo coliformes, indicadoras de poluição, para verificar a qualidade da água.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras

Foi estipulado um número total de seis diferentes amostras de água a serem analisadas e submetidas a duas técnicas laboratoriais: Técnica dos Tubos Múltiplos e Técnica da Membrana Filtrante. Das seis amostras analisadas, duas foram de águas de poço, duas de águas minerais e duas de águas de rio. Para cada amostra foram realizadas três repetições pela Técnica dos Tubos Múltiplos e cinco repetições pela Técnica da Membrana Filtrante. Para cada repetição das amostras de água submetidas à Técnica dos Tubos Múltiplos, foram realizadas coletas em três dias diferentes. Na Técnica da Membrana Filtrante as repetições foram realizadas a partir de duas coletas de cada amostra. Após cada coleta as amostras foram levadas para o laboratório e submetidas às análises.

2.2. Meios de Cultura

2.2.1. Caldo Lactosado

Extrato de carne	—	3,0 g
Peptona	—	5,0 g
Lactose	—	5,0 g

O pH foi ajustado para 7,0 com 0,1 ou 1N de NaOH ou HCl, quando necessário.

2.2.2. Caldo Lactosado Verde Bile Brillante

Peptona de gelatina	—	10,0 g
Bile de boi	—	20,0 g
Lactose	—	10,0 g
Verde brilhante	—	0,0133 g

O pH foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ com 0,1 ou 1N de NaOH ou HCl, quando necessário.

2.2.3. Caldo EC

Peptona de Caseína	—	20,0 g
Lactose	—	5,0 g
Mistura de sais de biliar	—	1,5 g
Cloreto de Sódio	—	5,0 g
Hidrogenofosfato de Dipotássio	—	4,0 g
Dihidrogenofosfato de Potássio	—	1,5 g

O pH foi ajustado para $6,9 \pm 0,1$ com 0,1 ou 1N de NaOH ou HCl, quando necessário.

2.2.4. M-Endo Broth

Bacto Yeast Extract	—	1,5 g
Bacto Casitone	—	5,0 g
Bacto Thiopeptone	—	5,0 g
Bacto Tryptose	—	10,0 g
Bacto Lactose	—	12,5 g
Desoxicolato de Sódio	—	0,1 g
Fosfato Dipotássico	—	4,375 g
Fosfato Monopotássico	—	1,375 g
Cloreto de Sódio	—	5,0 g
Lauril Sulfato de Sódio	—	0,05 g
Sulfito de Sódio	—	2,1 g
Bacto Fucsina Básico	—	1,05 g

Acrescentar 1,5 % de ágar neste meio

2.2.5. M-FC Broth

M-FC Broth	—	7,4 g
Ágar	—	3,0 g
Água destilada	—	200 ml

2.3. Preparação de material

Os meios de cultura, as vidrarias e os palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1atm e temperatura de 120°C por 20 minutos. As vidrarias e palitos de transferência, após esterilização, foram colocados para secar em forno Pasteur a 100°C por 12 horas.

2.4. Técnica dos Tubos Múltiplos

Essa técnica foi realizada no Laboratório de Microbiologia, pertencente ao Departamento de Patologia Básica da UFPR.

De acordo com a CETESB (1984), essa técnica permite estimar o NMP (número mais provável) de bactérias presentes em uma amostra de água.

2.4.1. Determinação de Coliformes Totais

Consistiu na distribuição de volumes da amostra de água, com o auxílio de pipetas graduadas, em séries de tubos de ensaio contendo meio de Caldo Lactosado e tubos de Durham. Para cada repetição realizada foram inoculados: volumes de 10ml em 5 tubos de ensaio contendo Caldo Lactosado em dupla concentração; volumes de 1ml em 5 tubos de ensaio com Caldo Lactosado em concentração normal e volumes de 0,1ml em 5 tubos com Caldo Lactosado também em concentração normal. Em seguida o material foi incubado à $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em estufa de cultivo, por 24 – 48 horas. Após esse período realizou-se a leitura de cada amostra, considerando a formação de gás no interior dos tubos de Durham como prova positiva para a presença de bactérias do grupo Coliforme. Com o auxílio de palitos de transferência, foram feitas inoculações das provas positivas para tubos contendo meio de Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante e tubos de Durham, para realização da prova confirmativa, e incubou-se em estufa de cultivo à $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após esse período foi feita a leitura de cada amostra, considerando a formação de gás no interior dos tubos de Durham como prova positiva e confirmativa para a presença de bactérias do grupo Coliforme.

2.4.2. Determinação de Coliformes Fecais

Consistiu na inoculação, com o auxílio de palitos de transferência, de material proveniente dos tubos positivos de Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante, em tubos de ensaio contendo meio de Caldo EC e tubos de Durham. Após a inoculação, incubou-se o material em estufa de cultivo à $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 horas. A produção de gás no interior dos tubos de Durham foi considerado como prova positiva para presença de bactérias do grupo dos coliformes fecais.

2.5. Técnica da Membrana Filtrante

Essa técnica foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Sanepar.

2.5.1. Determinação de Coliformes Totais

Essa técnica consistiu na filtração a vácuo de volumes de 100ml, da amostra de água a ser analisada, através de membrana filtrante quadriculada e com porosidade de $0,45\mu\text{m}$. Os microrganismos a serem detectados, por apresentarem dimensões maiores, ficaram retidos na superfície da membrana que foi transferida para uma placa de Petri, com condições perfeitas de vedação, contendo meio de cultura seletivo e diferencial M-Endo Broth (item 2.2.4). Por capilaridade o meio se difundiu para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período de incubação em banho-maria com agitação mecânica constante por 18-24hs à $35 \pm 0,5$ °C, observou-se a formação de colônias com características típicas de coliformes (rosa ou vermelho-escuras, com brilho metálico).

A partir da contagem dessas colônias, calculou-se a densidade de coliformes totais presentes na amostra.

2.5.2. Determinação de Coliformes Fecais

O processo para filtração foi o mesmo utilizado para a determinação dos coliformes totais (item 2.5.1.). Após a filtração a membrana foi colocada em uma placa de Petri contendo meio de cultura M-FC, seletivo e diferencial para detecção de coliformes fecais, e incubada em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Observou-se a formação de colônias típicas de coliformes fecais (colônias azuis).

A partir da contagem dessas colônias, calculou-se a densidade de coliformes fecais presentes na amostra.

2.6. Análise dos resultados

Na Técnica dos Tubos Múltiplos a leitura dos resultados foi feita de acordo com as tabelas para classificação de águas estabelecidas pela Resolução do CONAMA N° 20 - 18/06/1986.

Na Técnica da Membrana Filtrante a leitura dos resultados foi feita de acordo com a Portaria N° 36, certificada pela ISO-9002.

Também foram realizadas análises estatísticas (análise de variância e teste Tukey) dos dados encontrados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi determinado um número total de seis amostras de águas de diferentes origens para serem submetidas à análise bacteriológica para detecção de presença ou ausência de coliformes indicadores de poluição fecal. Das seis amostras analisadas, duas foram de água de poço (P-1 e P-2), duas de água mineral (AM-1 e AM-2) e duas de água de rio (R-1 e R-2). As amostras foram submetidas à análises pela técnica dos Tubos Múltiplos (três repetições de cada amostra, com uma coleta para cada repetição), na qual foram utilizados os meios de cultura Caldo Lactosado (foto 2), Caldo Lactosado Verde Bile Brillante (foto 3) e Caldo EC (foto 3) e pela técnica da Membrana Filtrante (fotos 4 e 5) (cinco repetições provenientes de duas coletas de cada amostra), na qual se utilizou os meios de cultura M-Endo e M-FC (foto 6).

Na foto 1 pode ser vista uma análise completa para uma repetição de uma amostra analisada pela Técnica dos Tubos Múltiplos.

3.1. Técnica dos Tubos Múltiplos

Os valores de Número Mais Provável (NMP), calculados através da tabela A (em anexo), de coliformes totais e fecais encontrados nas amostras analisadas por esta técnica encontram-se, respectivamente nas tabelas I e II.

As tabelas III e VI referem-se aos valores convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos.

As análises estatísticas realizadas para coliformes totais encontram-se nas tabelas IV e V e para coliformes fecais nas tabelas VII e VIII.

Tabela I – NMP de coliformes totais/100ml de água obtidos nos tubos contendo Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante

Origens	Repetições		
	A	B	C
P – 1	80	110	80
P – 2	500	900	900
AM – 1	< 2	< 2	< 2
AM – 2	< 2	2	2
R – 1	1600	1600	1600
R – 2	1600	1600	1600

Tabela II – NMP de coliformes fecais/100ml de água obtidos nos tubos contendo meio EC

Origens	Repetições		
	A	B	C
P – 1	50	80	80
P – 2	300	900	900
AM – 1	< 2	< 2	< 2
AM – 2	< 2	2	2
R – 1	1600	1600	1600
R – 2	1600	1600	1600

Origens: amostras de água

P – 1 e P – 2: poço 1 e poço 2

AM – 1 e AM – 2: água mineral 1 e água mineral 2

R – 1 e R – 2: rio 1 e rio 2

Observou-se que o poço 2 apresentou uma maior contaminação por coliformes (totais e fecais) em relação ao poço 1; as águas minerais apresentaram um baixo nível de contaminação, sendo que na água mineral 1 não se detectou contaminação (tabela A). As águas dos rios apresentaram um alto grau de contaminação e, por esta técnica, as leituras foram iguais, tanto para coliformes totais como fecais.

Foi feita uma análise de variância dos dados encontrados e aplicou-se um teste de hipótese (F) para observar as relações entre as amostras e suas repetições.

Os dados encontrados encontram-se nas tabelas que seguem.

Tabela III – Dados relativos ao NMP de coliformes totais/100ml, encontrados em três repetições (A, B, C) das diferentes amostras, convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos.

Origens	A	B	C	Total
P – 1	80	110	80	270
P – 2	500	900	900	2300
AM – 1	0,5	0,5	0,5	1,5
AM – 2	0,5	2	2	4,5
R – 1	1600	1600	1600	4800
R – 2	1600	1600	1600	4800
Total	3781	4212,5	4182,5	12176

Os valores com resultado < 2 foram substituídos por 0,5 para realização dos cálculos.

Tabela IV – Análise de variância dos dados relativos ao número de coliformes totais/100ml encontrados nas diferentes amostras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Origens	5	8911253,277	1782250,655	202,72 **
Repetições	2	19349,694	9674,847	1,1 ns
Erro	10	87918,474	8791,8474	
Total	17	9018521,445		

GL: Grau de liberdade

SQ: Soma dos quadrados

QM: Quadrado médio

F: Teste de hipótese

****:** significativo a nível de 1%

ns: não significativo

O valor de 1,1 encontrado em F não foi significativo, mostrando que não houve diferença entre as repetição de cada amostra.

O valor de 202,72 encontrado em F foi altamente significativo, mostrando que existe diferenças entre as amostras analisadas, ou seja, pelo menos uma delas apresenta nível de contaminação diferente das outras. Para se delimitar os diferentes níveis e dispor os mesmos em ordem decrescente de contaminação, realizou-se um teste Tukey.

Tabela V – Médias relativas ao número de coliformes totais, dispostas em ordem decrescente com a respectiva representação de sua significância

Origens	X	Tukey 1%	Tukey 5%
R – 2	1600	a	a
R – 1	1600	a	a
P – 2	766,67	b	b
P – 1	90	c	c
AM – 2	1,5	c	c
AM – 1	0,5	c	c

X: média das origens.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado (1% ou 5 %).

Desvio Médio de Significância (DMS): Tukey 1 % → DMS = 348,09

Tukey 5 % → DMS = 265,8

Observou-se que tanto para o DMS de 1% quanto para o de 5%, a classificação foi a mesma.

Tabela VI – Dados relativos ao NMP de coliformes fecais/100ml, encontrados em três repetições (A, B, C) das diferentes amostras, convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos

Origens	A	B	C	Total
P – 1	50	80	80	210
P – 2	300	900	900	2100
AM – 1	0,5	0,5	0,5	1,5
AM – 2	0,5	2	2	4,5
R – 1	1600	1600	1600	4800
R – 2	1600	1600	1600	4800
Total	3551	4182,5	4182,5	11916

Os valores com resultado < 2 foram substituídos por 0,5 para realização dos cálculos.

Tabela VII – Análise de variância dos dados relativos ao número de coliformes fecais/100ml encontrados nas diferentes amostras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	8956315,5	1791263,1	91,25 **
Blocos	2	44310,25	22155,125	1,13 ns
Erro	10	196291,25	19629,125	
Total	17	9196917		

GL: Grau de liberdade

SQ: Soma dos quadrados

QM: Quadrado médio

F: Teste de hipótese

****:** significativo a nível de 1%

ns: não significativo

O valor de 1,13 encontrado em F não foi significativo, mostrando que não houve diferença entre as repetição de cada amostra.

O valor de 91,25 encontrado em F foi altamente significativo, mostrando que existe diferenças entre as amostras analisadas, ou seja, pelo menos uma delas apresenta nível de contaminação diferente das outras. Para se delimitar os diferentes níveis e dispor os mesmos em ordem decrescente de contaminação, realizou-se um teste Tukey.

Tabela VI – Médias relativas ao número de coliformes fecais, dispostas em ordem decrescente com a respectiva representação de sua significância

Origens	X	Tukey 1%	Tukey 5%
R – 2	1600	a	a
R – 1	1600	a	a
P – 2	700	b	b
P – 1	70	c	c
AM – 2	1,5	c	c
AM – 1	0,5	c	c

X: média das origens.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado (1% ou 5 %).

Desvio Médio de Significância (DMS): Tukey 1 % → DMS = 520,12

Tukey 5 % → DMS = 397,16

Observou-se que tanto para o DMS de 1% quanto para o de 5%, a classificação foi a mesma.

3.2. Técnica da Membrana Filtrante

Os números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de coliformes totais e fecais encontrados nas amostras analisadas por esta técnica encontram-se, respectivamente, nas tabelas IX e X.

As tabelas XI e XIV referem-se aos valores convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos.

As análises estatísticas realizadas para coliformes totais encontram-se nas tabelas XII e XIII e para coliformes fecais nas tabelas XV e XVI.

Tabela IX – UFC de coliformes totais obtidas nas placas contendo meio M-Endo

Origens	Repetições				
	A	B	C	D	E
P – 1	4	4	3	7	4
P – 2	103	109	142	129	156
AM – 1	< 1	2	9	3	< 1
AM – 2	3	1	1	1	< 1
R – 1	20000	10400	10400	16000	20000
R – 2	20000	20000	20000	20000	20000

Tabela X – UFC de coliformes fecais obtidas nas placas contendo meio M-FC

Origens	Repetições				
	A	B	C	D	E
P – 1	2	1	2	2	4
P – 2	10	61	32	28	46
AM – 1	< 1	< 1	2	1	< 1
AM – 2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
R – 1	11200	8400	7200	4400	6400
R – 2	20000	20000	20000	20000	20000

Origens: amostras de água.

P – 1 e P – 2: poço 1 e poço 2

AM – 1 e AM – 2: água mineral 1 e água mineral 2

R – 1 e R – 2: rio 1 e rio 2

Observou-se que o poço 2 apresentou uma maior contaminação por coliformes (totais e fecais) em relação ao poço 1; já as águas minerais apresentaram uma leitura diferente em relação à Técnica dos Tubos Múltiplos (a água mineral 1 apresentou maior contaminação em relação à 2, sendo que nenhum coliforme fecal foi detectado nesta última). As águas dos rios apresentaram um alto grau de contaminação e, por esta técnica, as leituras foram diferentes, tanto para coliformes totais como fecais, sendo que o rio 2 apresentou uma maior contaminação que o rio 1. Esta técnica é mais precisa porque através dela podemos detectar diferenças na contagem dos números de colônias (comparar os resultados obtidos nas contagens R – 1 e R – 2 das duas técnicas).

Foi feita uma análise de variância dos dados encontrados e aplicou-se um teste de hipótese (F) para observar as relações entre as amostras e suas repetições.

Os dados encontrados encontram-se nas tabelas que seguem.

Tabela XI – Dados relativos às UFCs de coliformes totais/100ml, encontrados em cinco repetições (A, B, C, D, E) das diferentes amostras, convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos

Origens	A	B	C	D	E	Total
P – 1	4	4	3	7	4	22
P – 2	103	109	142	129	156	639
AM – 1	0,5	2	9	3	0,5	15
AM – 2	3	1	1	1	0,5	6,5
R – 1	20000	10400	10400	16000	20000	76800
R – 2	20000	20000	20000	20000	20000	100000
Total	40110,5	30516	30555	36140	40161	177482,5

Os valores com resultado < 1 foram substituídos por 0,5 para realização dos cálculos.

Tabela XII. – Análise de variância dos dados relativos ao número de coliformes totais/100ml encontrados nas diferentes amostras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	2129728554	425945710,8	110,31 **
Blocos	4	15447408,71	3861852,178	1,00 ns
Erro	20	77226621,29	3861331,065	
Total	29	2222402584		

GL: Grau de liberdade

SQ: Soma dos quadrados

QM: Quadrado médio

F: Teste de hipótese

****:** significativo a nível de 1%

ns: não significativo

O valor de 1,00 encontrado em F não foi significativo, mostrando que não houve diferença entre as repetição feitas para cada amostra.

O valor de 110,31 encontrado em F foi altamente significativo, mostrando que existe diferenças entre as amostras analisadas, ou seja, pelo menos uma delas apresenta nível de contaminação diferente das outras. Para se delimitar os diferentes níveis e dispor os mesmos em ordem decrescente de contaminação, realizou-se um teste Tukey.

Tabela XIII – Médias relativas ao número de coliformes totais, dispostas em ordem decrescente com a respectiva representação de sua significância

Origens	X	Tukey 1%	Tukey 5%
R – 2	20000	a	a
R – 1	15360	a	b
P – 2	127,8	b	c
P – 1	4,4	b	c
AM – 1	3	b	c
AM – 2	1,3	b	c

X: média das origens.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado (1% ou 5 %).

Desvio Médio de Significância (DMS): Tukey 1 % → DMS = 4842,115

Tukey 5 % → DMS = 3910,6

Observou-se que houve diferença na categorização das amostras de acordo com o DMS utilizado. Para o DMS do teste Tukey 1%, as amostras foram classificadas em dois níveis (a, b) enquanto que para o teste Tukey 5%, a classificação foi em três níveis (a, b, c).

Tabela XIV – Dados relativos às UFCs de coliformes fecais/100ml, encontrados em cinco repetições (A, B, C, D, E) das diferentes amostras, convertidos e organizados para realização dos cálculos estatísticos

Origens	A	B	C	D	E	Total
P – 1	2	1	2	2	4	11
P – 2	10	61	32	28	46	177
AM – 1	0,5	0,5	2	1	0,5	4,5
AM – 2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5
R – 1	11200	8400	7200	4400	6400	37600
R – 2	20000	20000	20000	20000	20000	100000
Total	31213	28463	27236,5	24431,5	26451	137795

Tabela XV. – Análise de variância dos dados relativos ao número de coliformes fecais/100ml encontrados nas diferentes amostras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	1649842895	329968579	311,35 **
Blocos	4	4213643,117	1053410,779	0,99 ns
Erro	20	21195841,88	1059792,094	
Total	29	1675252380		

GL: Grau de liberdade

SQ: Soma dos quadrados

QM: Quadrado médio

F: Teste de hipótese

****:** significativo a nível de 1%

ns: não significativo

O valor de 0,99 encontrado em F não foi significativo, mostrando que não houve diferença entre as repetição feitas para cada amostra.

O valor de 311,35 encontrado em F foi altamente significativo, mostrando que existe diferenças entre as amostras analisadas, ou seja, pelo menos uma delas apresenta nível de contaminação diferente das outras. Para se delimitar os diferentes níveis e dispor os mesmos em ordem decrescente de contaminação, realizou-se um teste Tukey.

Tabela XVI – Médias relativas ao número de coliformes fecais, dispostas em ordem decrescente com a respectiva representação de sua significância

Origens	X	Tukey 1%	Tukey 5%
R – 2	20000	a	a
R – 1	7520	b	b
P – 2	35,4	c	c
P – 1	2,2	c	c
AM – 1	0,9	c	c
AM – 2	0,5	c	c

X: média das origens.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado (1% ou 5 %).

Desvio Médio de Significância (DMS): Tukey 1 % → DMS = 2536,76

Tukey 5 % → DMS = 2048,73

Observou-se que tanto para o DMS de 1% quanto para o de 5%, a classificação foi a mesma.

É importante salientar que um número maior de repetições deveria ser feito, principalmente entre as águas que acusaram diferenças entre as duas técnicas utilizadas.

4. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

Ocorreram variações no número de coliformes entre as repetições de cada amostra, dentro da mesma técnica e entre as técnicas, que poderiam ser atribuídas à diversos fatores, entre outros, às variações das condições ambientais, local de trabalho, e metodologia adotada pelo analisador.

A técnica da Membrana Filtrante é mais precisa do que a técnica dos Tubos Múltiplos com relação à quantificação dos coliformes, pois pode-se observar com precisão o número de colônias que se formam sobre o meio nas placas de Petri (como exemplo comparar os resultados obtidos na análise dos rios pelas duas técnicas: na Técnica dos Tubos Múltiplos a leitura foi a mesma para todas as repetições das duas as amostras tanto para coliformes totais quanto fecais, enquanto que na Técnica da Membrana Filtrante as leituras foram diferenciadas), além de ser uma técnica mais rápida e mais simples de ser feita.

O custo inicial com os equipamentos laboratoriais principais (bomba de vácuo, e estufa de incubação com banho-maria e agitação mecânica constante) seria a única desvantagem, mas considerando já ter os equipamentos os gastos futuros serão bem mais reduzidos em relação à técnica dos Tubos Múltiplos, pois utiliza menor quantidade de meios de cultura.

Uma vez que todas as águas analisadas, de uma forma ou de outra, apresentaram contaminação a continuidade deste trabalho com uma amostragem maior das diferentes águas e um maior número de repetições seria recomendável, para localização dos possíveis focos de contaminação e tratamento dos mesmos.

5. ANEXOS

Tabela A: Tabela para o cálculo do NMP – Técnica dos Tubos Múltiplos

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados			Índice de NMP por 100ml	Limites de confiança 95 %	
5 tubos de 10ml	5 tubos de 1ml	5 tubos de 0,1ml		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

Tabela A: Tabela para o cálculo do NMP – Técnica dos Tubos Múltiplos (continuação)

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados			Índice de NMP por 100ml	Limites de confiança 95 %	
5 tubos de 10ml	5 tubos de 1ml	5 tubos de 0,1ml		Inferior	Superior
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	-	-

Foto 1: Técnica dos tubos múltiplos, mostrando uma bateria completa de testes positivos (observar formação de gás no interior dos tubos de Durham) para uma repetição de uma das amostras.

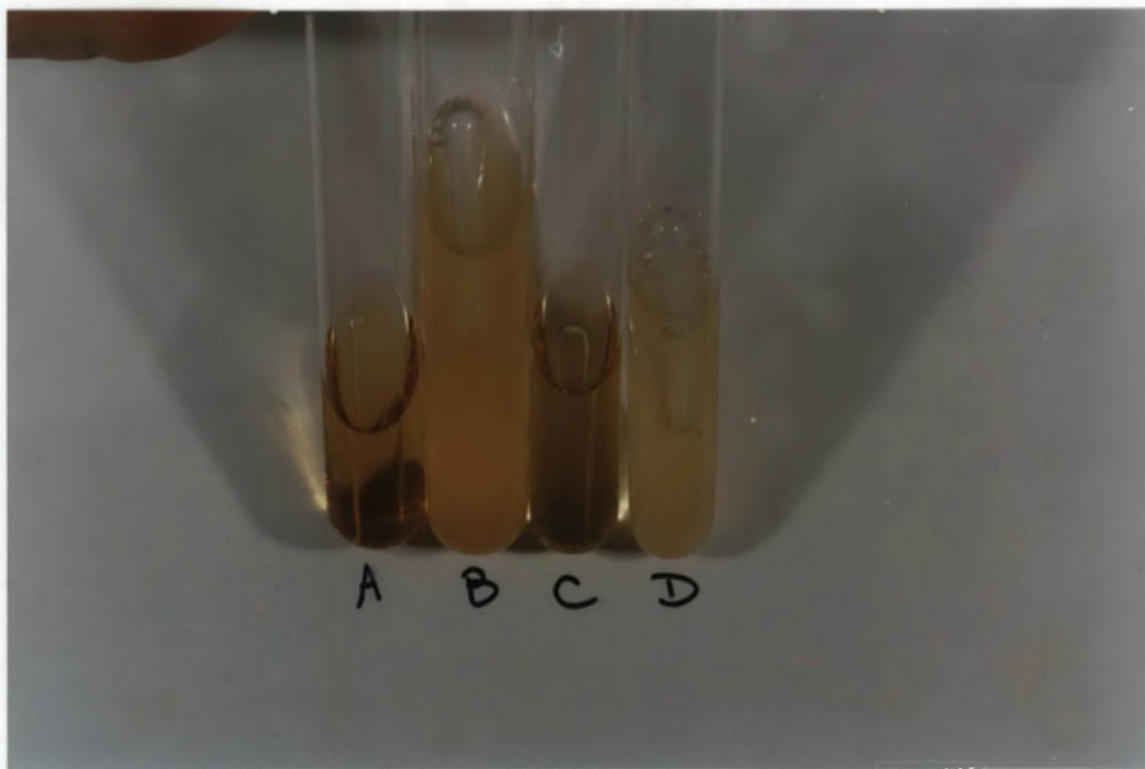


A: tubos contendo meio de Caldo Lactosado.

B: tubos contendo meio de Caldo Lactosado Verde Bile Brilhante (indicando presença de coliformes totais).

C: tubos contendo meio de Caldo EC (indicando presença de coliformes fecais).

Foto 2: Comparação entre meios de Caldo Lactosado (CL) controle e meios com prova positiva.



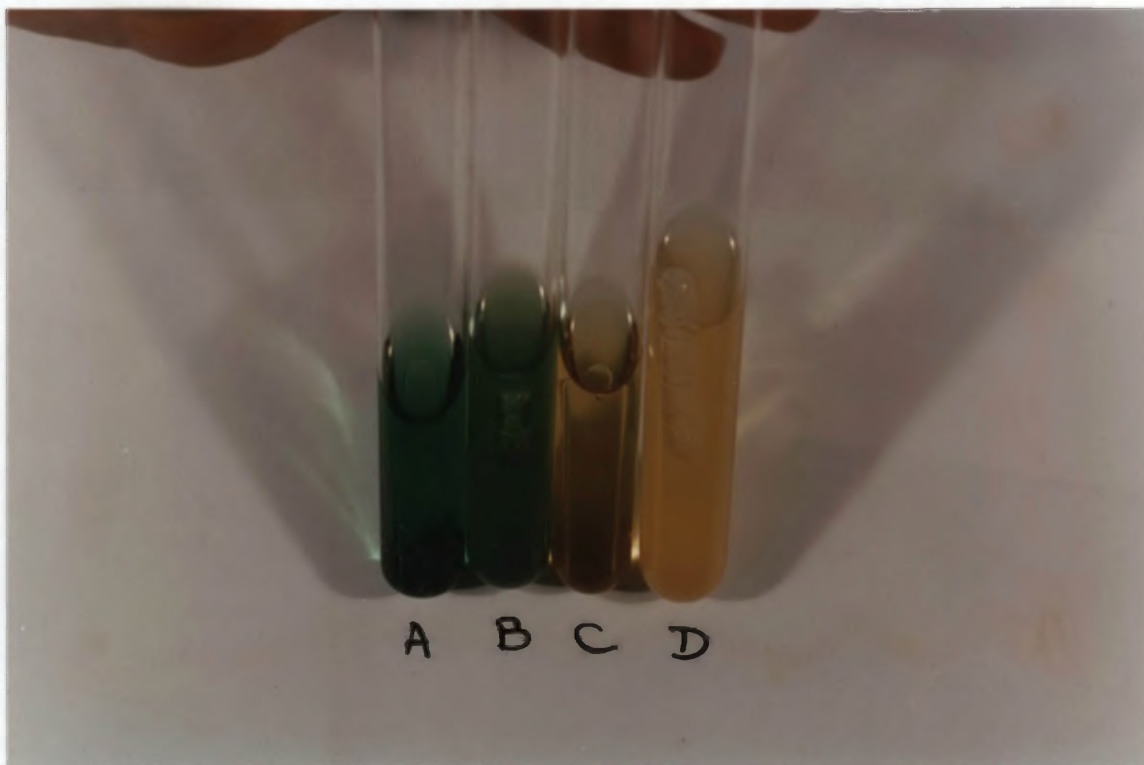
A: tubo de ensaio controle contendo CL em dupla concentração e tubos de Durham.

B: tubo de ensaio contendo CL em dupla concentração e tubos de Durham, com prova positiva (observar formação de gás no interior do tubo).

C: tubo de ensaio controle contendo CL em concentração normal e tubos de Durham.

D: tubo de ensaio contendo CL em concentração normal e tubos de Durham, com prova positiva (observar formação de gás no interior do tubo).

Foto 3: Comparação entre meios de Caldo Lactosado Verde Bile Brillante (CLVBB) controle e meios com prova positiva e comparação entre meios de Caldo EC (CEC) controle e meios com prova positiva.



- A:** tubo de ensaio controle contendo CLVBB e tubos de Durham.
B: tubo de ensaio contendo CLVBB e tubos de Durham, com prova positiva para coliformes totais (observar formação de gás no interior do tubo).
C: tubo de ensaio controle contendo CEC e tubos de Durham.
D: tubo de ensaio contendo CEC e tubos de Durham, com prova positiva para coliformes fecais (observar formação de gás no interior do tubo).

Foto 4: Equipamentos utilizados na técnica da Membrana Filtrante



A: Porta-filtros sartórios

B: Local onde se coloca a membrana filtrante

C: Local de inserção da ligação com a bomba de vácuo

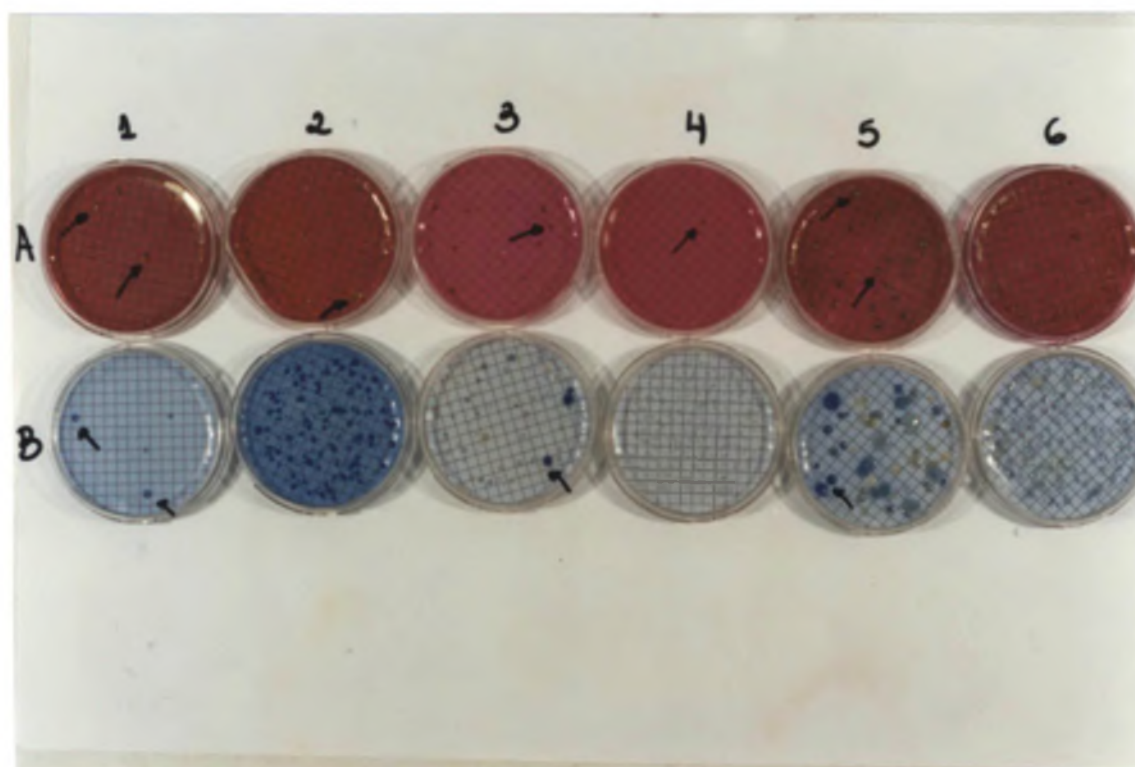
Foto 5: Equipamentos utilizados na técnica da Membrana Filtrante. prontos para uso.



A: Porta-filtros sartório

B: Local de inserção da ligação com a bomba de vacuo

Foto 6: Meios de cultura e exemplares de cada amostra de água analisada pela Técnica da Membrana Filtrante



A: Placas de Petri contendo meio seletivo e diferencial M-Endo, para detecção de coliformes totais.

B: Placas de Petri contendo meio seletivo e diferencial M-FC, para detecção de coliformes fecais.

1: Repetição de uma amostra de água do poço 1.

2: Repetição de uma amostra de água do poço 2.

3: Repetição de uma amostra da água mineral 1.

4: Repetição de uma amostra da água mineral 2.

5: Repetição de uma amostra de água do rio 1.

6: Repetição de uma amostra de água do rio 2.

↗: Colônias de coliformes totais (verde-brilhantes e vermelho-escuras).

↖: Colônias de coliformes fecais (azuis)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB Técnica de Abastecimento e Tratamento de Água. 2ºed.rev. São Paulo: CETESB, 1984. 549p.
- CIEBIN, B. W.; BRODSKY, M. H.; REDDINGTON, R.; HORSNELL, G.; CHONEY, A.; PALMATEER, G.; LEY, A.; JOSHI, R.; SHEARS, G. Comparative evaluation of modified M-FC and M-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.11, p.3940-3942, 1995.
- EMILIANI, F.; SUNE, N. Relaciones entre coliformes fecales, lluvias y nivel hidrometrico (Rio Salado, Sto. Tome, Sta Fe). **Rev. Asoc. Ciencias Naturales. Litor**. v.21, n.1, p.99-102, 1990.
- GALE, P.; BROBERG, P. J. Evaluation of a rapid , defined substrate technology method for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in chlorinated drinking water. **Letters in Applied Microbiology**. v.15, n.5, p.200-203, 1993.
- GIAMMANCO, G.; PIGNATO, S.; BIONDI, M. An enzymatic procedure for the confirmation of total coliforms and *Escherichia coli* enumeration from water. **Zentralblatt Fuer Hygiene und Umweltmedizin**. v.193, n.2, p.99-105, 1992.
- FARMER, J. J. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae*. **Journal Clinical Microbiological**. v.21, p.46, 1985.
- JERMINI, M.; DOMENICONI, F.; JAEGGLI, M. Evaluation of C-EC-agar, a modified MFC-agar for the simultaneous enumeration of fecal coliforms and *Escherichia coli* in water samples. **Letters in Applied Microbiology**. v.19, n.5, p.332-335, 1994.
- LUKSAMIJARULKUL, P.; PUMPSUWAN, V.; PUNGCHITTON, S. Microbiological quality of drinking water of a Chao Phya River community, Bangkok. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public-Health**. v.25, n.4, p.633-637, 1994.
- MALIK, A.; QADRI, S.A.; MUSARRAT, J.; AHMAD, M. Studies on the water quality of River Ganga at Fatehgarh and Kannauj, U.P., India. **Environmental Toxicology and Water Quality**. v.10, n.2, p.91-95, 1995.

- MOREIRA, L.; AGOSTINHO, P.; MORAIS, P. V.; DA COSTA, M. S. Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. **Journal Applied Bacteriology**. v.77, n.3, p.334-339, 1994.
- MUNUERA, ECHAVE I.; GARCIA, BERMEJO D.; IBANEZ, GUILLEN J. J. Microbiological analysis of bottled drinking water commercialized in Seville. **Alimentaria**. v.31, n.257, p.39-42, 1994.
- PAPAPETROPOULOU, M.; PAGONOPOULOU, O. Improved methods for the isolation of coliform in drinking water of Patras. **Deltion Ellenikes Mikrobiologikes Etaireias**. v.40, n.4, p.346-350, 1995.
- PELCZAR, MICHAEL JOSEPH. Microbiologia das águas domésticas e dos esgotos residenciais **Microbiologia**. v. II, São Paulo: McGraw – Hill do Brasil, 1981. 1072p.
- RAMTEKE, P. W. Comparison of standard most probable number method with three alternate tests for detection of bacteriological water quality indicators. **Environmental Toxicology and Water Quality**. v.10, n.3, p.173-178, 1995.
- RAMTEKE, P.W.; PATHAK, S.P.; BHATTACHERJEE, J.W.; GOPAL, K.; MATHUR, N. Evaluation of the presence-absence (PA) test: A simplified bacteriological test for detecting coliforms in rural drinking water of India. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.33, n.1, p.53-59, 1994.
- ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. Microbiologia Sanitária. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 186p.
- SARTORY, D. P.; HOWARD, L. A medium detecting beta-glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. **Letters in Applied Microbiology**. v.15, n.6, p.273-276, 1992.
- TAK, T. C.; KACHHAWAHA, A.; SONGARA, M. C.; GOPAL, R. A rapid method for isolation of coliforms by BCFL medium. **Indian Journal of Environmental Health**. v.34, n.2, p.133-137, 1992.
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.