

# Aplicação da prova de confirmação na determinação do número de bactérias coliformes nas águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande\*

**Dr. DACIO DE ALMEIDA CHRISTOVÃO**

Assistente da Cadeira de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

**Eng. JOSÉ M. DE AZEVEDO NETTO**

Professor da Cadeira de Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Eng. Chefe, Divisão de Planejamento e Obras, Departamento de Águas e Esgotos, São Paulo.

**Eng. HAROLDO JEZLER**

Assistente da Cadeira de Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias da Faculdade de Higiene e Saúde Pública e da Cadeira de Hidráulica, Hidráulica Urbana e Saneamento da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

**Dr. HELVÉCIO BRANDÃO**

Assistente da Cadeira de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

## INTRODUÇÃO

Estudo realizado em 1954, por Christovão, Azevedo Netto e Jezler (2), veio revelar, nas águas das praias de Santos e São Vicente, a ocorrência de densidade de microrganismos coliformes acima dos padrões de baïneabilidade comumente adotados e confirmou a intensa e extensa contaminação das águas da Praia Grande. Este último achado era, em grande parte, naturalmente esperado, em vista do lançamento na enseada do Itaipu, em local muito próximo à praia, dos esgotos **in natura** de ambas as cidades nomeadas.

O exame das águas em questão fôra realizado — de acordo com o especificado nos métodos padrões norte-americanos então vigentes (6) — através do emprêgo exclusivo da "prova de presunção". Dada a escassez absoluta de dados sobre a eficiência dessa prova em exame de água do mar, foi empreendido o presente trabalho para averiguar sua especificidade nas águas das praias mencionadas. Em vista do conhecido poder bactericida das águas marítimas e da maior resistência dos esporos, tanto a agentes físicos como químicos, havia a possibilidade de uma proporção bem maior de resultados, do que a normal em águas doces, ser devida aos bacilos esporulados comumente encontrados nos esgotos. No caso desta hipótese ser verdadeira, não poderia o exame de tais águas ser realizado únicamente através da prova de presunção, passando a requerer confirmação dos resultados.

Posteriormente à referida investigação de 1954 — entre outras medidas tendentes a corrigir a situação evidenciada ou a melhor caracterizá-la — foi instituído o exame periódico das águas em questão, através da mesma "prova de presunção". Os resultados advindos do presente estudo serviriam de subsídio para a decisão sobre a melhor técnica de realização do referido exame.

## TÉCNICAS

**I — Amostras: locais de amostragem, coleta e transporte** — Como já foi descrito detalhadamente em trabalho anterior (2), foram estabelecidos seis locais de tomada de amostras — S1 a S6 — na praia de Santos, sete — V1 a V7 — nas praias da cidade de

(\*) Trabalho realizado nas Cadeiras de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dr. Lucas Assumpção) e Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias (Prof. Eng. José M. de Azevedo Netto) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Apresentado ao Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina, em 14 de setembro de 1956.

São Vicente e dez — C1 a G10 — na Praia Grande. Em cada local foram coletadas duas amostras por vez, uma — R — no ponto em que a profundidade das águas era de aproximadamente 0,75 m, outra — F — em parte mais profunda, cerca de 1,50 m.

Detalhes sobre o equipamento de coleta e o transporte das amostras d'água, assim como sobre a maneira como foram realizadas essas operações já foram descritas (2). Deve ser notada que as amostras foram sempre colhidas nas primeiras horas da manhã, entre 7,00 e 9,00 h, de um grupo de locais de cada vez — Santos, São Vicente ou Praia Grande — e que a coleta foi realizada três vezes por semana.

**II — Medida de eficiência da prova de presunção** — As técnicas seguidas obedeceram rigorosamente aos métodos padrões norte-americanos (6). A prova de presunção foi realizada pela inoculação das amostras d'água em caldo lactosado. De cada amostra examinaram-se duas sub-amostras A e B, empregando-se duas séries iguais de quatro "diluições" decimais, e de cada "diluição" inocularam-se três tubos de meio de cultura. Todos os exames foram feitos, portanto, em duplicata e cada amostra requereu o emprêgo de 24 tubos de caldo lactosado.

As "diluições" ou volumes empregados para a água dos três primeiros locais de amostragem da Praia Grande, onde era de se esperar a maior freqüência de coliformes, foram de 1,0 — 0,1 — 0,01 e 0,001 ml. Para todas as outras amostras usou-se a combinação de 10 — 1 — 0,1 e 0,01 ml. A leitura da prova de presunção foi feita às 24 e às 48 h de incubação. No fim de cada período, as culturas de todos os tubos positivos foram submetidos a prova de confirmação em caldo-bile-lactose-verde-brilhante, com incubação de 48 h.

O método utilizado permitia julgar da conveniência de se utilizar a prova de confirmação, tanto pelo número de porções confirmadas, como através de determinação dos "números mais prováveis", N. M. P., obtidos em cada exame; as estimativas dos N. M. P. foram obtidas diretamente pelas tabelas de Hoskins (5).

A realização dos exames em duplicata, pelo emprêgo das duas sub-amostras A e B foi levada a efeito devido, principalmente, à variabilidade do N. M. P. A obtenção de dois N. M. P. para cada amostra, oferecia a vantagem de, através do seu valor médio, se ter maior probabilidade de se aproximar do verdadeiro valor do que ocorreria fazendo-se um único exame.

**III — Número de exames** — Contando-se as sub-amostras A e B, foram realizados, ao todo, 276 exames — 72 da praia de Santos, 84 das praias de São Vicente e 120 da Praia Grande. Tendo-se inoculado, na prova de presunção, três porções de cada uma de quattro "diluições" (ou volumes) de cada sub-amostra, segue-se que se examinou o total de 3.312 porções.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro I apresenta, separadamente para as praias de Santos, São Vicente e Praia Grande, o número de porções positivas em cada período da prova de presunção e na prova de confirmação respectiva. São apresentados tanto os totais de cada um desses grupos como os números de porções positivas, correspondentes a cada volume inoculado. No quadro II, podem ser vistos os dados análogos obtidos ao se considerar as praias em conjunto. Nêle também são apresentadas as percentagens de porções positivas encontradas para cada nível de volume inoculado.

Considerando os totais que se encontram no quadro II, vê-se que 1 834 porções, 55,4% das 3 312 examinadas, foram positivas na prova de presunção às 24 h e que mais 228 porções, 6,9%, se positivaram nas segundas 24 h de incubação, elevando o total para 2 062, ou 62,3%. Dessas 2 062, todas inoculadas em caldo-bile-lactose-verde-brilhante, 1 668 foram confirmadas, 50,4% do total examinado e 80,9% das positivas na prova de presunção. Pelos resultados apresentados, pode também ser calculado que foram confirmadas 86,9% das porções presumivelmente positivas às 24 h, somente 32,9% das positivas de 24 a 48 h de incubação e que o número total de porções confirmadas corresponde a 90,9% das presumivelmente positivas às 24 h.

Resultados análogos são obtidos ao se considerar separadamente as águas das praias de Santos, São Vicente ou Praia Grande. Pode ser calculado pelos dados do quadro I, que nas águas de Santos as percentagens de confirmação foram de 91,6 — 28,3 e 86,9, dentre, respectivamente, as porções presumivelmente positivas às 24 h, de 24 a 48 h e até

**QUADRO I**

**Comparação entre a Prova de Presunção e a de Confirmação na Pesquisa de Coliformes em Amostras d'Água das Praias de Santos, São Vicente e Praia Grande  
Número de porções positivas segundo o volume inoculado e tempo de incubação da prova de presunção**

Praia	Volume	Prova de presunção positiva			Prova de confirmação positiva		
		Até 24 h (1)	De 24 a 48 h (2)	Até 48 h (3)	A partir de (1)	A partir de (2)	A partir de (3)
Santos (*)	10	216	0	216	215	0	215
	1	211	5	216	203	5	208
	0,1	217	27	154	94	7	101
	0,01	16	14	30	10	1	11
	Total	570	46	616	522	13	535
São Vicente (**)	10	252	0	252	252	0	252
	1	237	11	248	215	15	230
	0,1	121	48	169	82	13	95
	0,01	26	12	38	20	2	22
	Total	636	71	707	569	30	599
Praia Grande (***)	10	241	11	252	189	11	200
	1	218	60	278	168	17	185
	0,1	96	38	134	75	2	77
	0,01	50	1	51	50	1	51
	0,001	23	1	24	20	1	21
Total		628	111	739	502	32	534

(\*) — Na prova de presunção foram inoculadas 864 porções — 216 de cada volume indicado.

(\*\*) — Na prova de presunção foram inoculadas 1008 porções — 252 de cada volume indicado.

(\*\*\*) — Na prova de presunção foram inoculadas 1440 porções — 252 de 10 ml, 360 de cada um dos volumes de 1,0, 0,1, e 0,01 e 108 de 0,001 ml.

## QUADRO II

**Comparação entre a Prova de Presunção e a de Confirmação na Pesquisa de Coliformes em Amostras d'Água das Praias de Santos, São Vicente e Praia Grande, tomadas em conjunto.**  
**Número de porções positivas (\*) e percentagens respectivas, segundo o volume e tempo de incubação da prova de presunção**

Prova	Volume inoculado (ml)	Tempo de incubação da prova de presunção					
		Até 24 h		De 24 a 48 h		Até 48 h	
		N (*)	% (*)	N	%	N	%
Presunção positiva	10	709	98,5	11	1,5	720	100,0
	1	666	80,4	76	9,2	742	89,6
	0,1	344	41,5	113	13,6	457	55,2
	0,01	92	11,1	27	3,3	119	14,4
	0,001	23	26,0	141	8,0	600	34,0
	Total	1 834	55,4	228	6,9	2 062	62,3
Confirmação positiva	10	656	91,1	11	1,5	667	92,6
	1	586	70,8	37	4,5	623	75,2
	0,1	251	30,3	22	2,7	273	33,0
	0,01	80	19,9	4	1,5	84	10,1
	0,001	20	18,5	27	0,5	378	21,4
	Total	1 593	48,1	75	2,3	1 668	50,4

(\*) — Na prova de presunção foram inoculadas 3 312 porções — 720 de 10 ml, 828 de cada um dos volumes de 1, 0,1 e 0,01 ml e 108 de 0,001 ml.

às 48 h de incubação. Nas águas de São Vicente, as percentagens confirmadas nas mesmas condições foram, respectivamente, 89.5 — 42.3 e 84.7 e nas da Praia Grande, 79.9 — 28.8 e 72.3.

Estas percentagens, assim como os dados tabelados nos quadros I e II, são apresentados pela informação que fornecem a respeito da positividade nas provas de presunção e de confirmação, dos diferentes volumes das águas das várias praias. Como medida da eficiência da prova de presunção, ou seja, da necessidade ou não de se aplicar a prova de confirmação no exame em questão, o valor desses números é muito relativo. Realmente, quando se considera o total de porções dos vários volumes inoculados, a proporção confirmada, dentre as porções presuntivamente positivas, pode dar idéia bastante enganosa sobre a eficiência da prova de presunção. Sendo examinadas várias porções de diferentes volumes, selecionados de maneira a se obter — o mais freqüentemente possível — resultados confirmados em tôdas as porções dos volumes maiores, é óbvio que esse método de análise se ache viciado por tal contingente de porções quase necessariamente positivas. Nessas condições, o resultado passa a depender dos volumes escolhidos para exame ou dos volumes considerados na análise. Tal aspecto da questão, discutido pelo primeiro autor em trabalho anterior (1), pode ser apreciado através dos sub-totais de porções positivas, referentes aos volumes menores, também apresentados nos quadros I e II. A comparação entre êsses sub-totais encontrados na prova de presunção com seus respectivos sub-totais confirmados, dá muitas vezes, resultados bem diferentes daquêles obtidos pela comparação já realizada entre os totais positivos de todos os volumes. Isso pode ser bem apreciado no quadro III, onde se encontram tabelados, para as várias praias, tomadas separadamente ou em conjunto, os totais positivos para todos os volumes ou sómente para os dois volumes menores. A fim de facilitar a comparação, são apresentados para cada grupo de porções positivas, os índices correspondentes que se obtêm atribuindo-se o valor 100 ao número de porções confirmadas, a partir daquelas positivas na prova de presunção lida até às 48 h.

Verificando-se os índices correspondentes ao total de porções positivas havidas na prova de presunção com 24 h de incubação, parece não ser compensador o emprêgo da "prova de confirmação" na pesquisa das bactérias coliformes nas águas das praias de Santos e São Vicente. Os resultados da "prova da presunção" lida às 24 h de incubação aumentariam de muito pouco o número verdadeiro. No entanto, considerando-se apenas os dois volumes menores, vê-se que os índices respectivos aumentam bastante. Lembrando-se que a êsses volumes, pelos resultados apresentados nos quadros I e II, parece corresponder mais provavelmente o limiar de transição de positivo a negativo, dever-se-ia dar mais crédito à informação por êles fornecida do que aquela dada por todos os volumes.

O julgamento do valor prático da aplicação da prova de confirmação à determinação da qualidade sanitária das águas, através do número de porções positivas, é, assim, método falível. Embora tenha sido o processo básico usado na maioria das investigações desta natureza, não é método que forneça informação satisfatória, pelo menos tôdas as vezes que o exame requerer o uso de mais de um volume ou "diluição", como sucede mais freqüentemente.

O processo apropriado no caso é a medida da queda que ocorre nos valores dos N. M. P., passando-se da prova de presunção à de confirmação. O N. M. P. pode ser definido como "o número de organismos por unidade de volume que, na pesquisa da densidade bacteriana pelo método de diluição, de acordo com a teoria estatística, teria probabilidade maior que qualquer outro número possível, de dar o resultado de exame observado" (4). Citação da literatura mais importante sobre o N. M. P. foi apresentada pelo primeiro autor em trabalho anterior (1).

Os quadros IV, V e VI apresentam os N. M. P. obtidos no exame das águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande, respectivamente. Acham-se tabelados os N. M. P. de cada duplicata, resultantes da leitura da prova de presunção às 24 e 48 h e das provas de confirmação respectivas.

No quadro VII são apresentadas as médias aritmética e geométrica de cada série. Para facilitar a comparação, além do valor das médias, são apresentados também os índices correspondentes que se obtêm atribuindo-se o valor 100 à média dos N. M. P. resultantes da confirmação das porções presuntivamente positivas às 48 h. Nesse quadro, os dados relativos à Praia Grande se encontram classificados em dois grupos de locais de amostragem, 1 a 5 e 6 a 10, respectivamente, os locais de maior e menor contaminação. Tal divisão foi estabelecida arbitrariamente.

## QUADRO III

**Comparação entre a Prova de Presunção e a de Confirmação na Pesquisa de Coliformes em Amostras d'Água das Praias de Santos, São Vicente e Praia Grande.**  
**Número de porções positivas e índices<sup>(\*)</sup> correspondentes nas provas de presunção e confirmação, considerando-se todos os volumes inoculados ou sómente os volumes menores selecionados e segundo o tempo de incubação da prova de presunção.**

Águas das praias	Volumes inoculados considerados	Prova de presunção positiva		Prova de confirmação positiva	
		Até 24 h (1)	Até 48 h (2)	A partir de (1)	A partir de (2)
Santos	todos os volumes	570 107	616 115	522 98	535 100
	sómente os dois menores	143 128	184 164	104 93	112 100
São Vicente	todos os volumes	636 106	707 118	569 95	599 100
	sómente os dois menores	147 126	207 177	102 87	117 100
Praia Grande	todos os volumes	628 118	739 138	502 94	534 100
	sómente os dois menores	169 113	209 140	145 97	149 100
Total	todos os volumes	1834 110	2062 124	1593 96	1668 100
	sómente os dois menores	459 121	600 159	351 93	378 100

(\*) — Os números índices acham-se em itálico. O valor 100 foi atribuído ao número de porções confirmadas a partir das porções positivas na prova de presunção com incubação até 48 h.

Tem-se tomado, mais freqüentemente, a média geométrica como resumo de séries de N. M. P. Pelos índices relativos às médias geométricas obtidas na prova de presunção com 24 h de incubação, admitiríamos essa prova como tendo dado resultados consideravelmente exagerados, que variaram, em média, de 38%, nas águas das praias de São Vicente, a 100%, nas dos cinco primeiros locais de amostragem da Praia Grande. A média geométrica dos N. M. P. dá, assim, uma idéia sobre a eficiência da prova de presunção, bem diferente da fornecida pelo total de porções positivas e, mesmo, indica erro maior do que o revelado pelo sub-total de porções positivas encontradas nos dois volumes menores examinados.

Pela comparação dos N. M. P., dever-se-ia, pois, exigir o uso da prova de confirmação a fim de não se correr o risco de exagerar demasiadamente a densidade de coliformes das águas em questão.

Dada a informação relativamente restrita fornecida ao se compararem apenas médias, aritmética ou geométrica, de duas séries de valores, sem se levar em conta a variação dos valores dentro dessas séries, principalmente no caso dos N. M. P., em que essa variação é muito grande, resolveu-se apreciar os dados de mais outra maneira. Pareceu interessante testar o grau de concordância entre uma e outra prova e, também, ter uma idéia da distribuição das percentagens dos valores de confirmação, sobre os correspondentes da presunção. Para esta distribuição, foi escolhida, para medida de posição, a mediana, dada a assimetria de distribuição no qual predomina o valor 1, um dos extremos. Por outro lado, foi determinado um intervalo de confiança no nível de 5% — isto é, o intervalo ao qual se atribui 95% de probabilidade de conter o verdadeiro valor — tanto para a mediana, como para a percentagem de concordância.

## QUADRO IV

N. M. P. de bactérias coliformes, por 100 ml, das águas da praia de Santos, por dia, local de amostragem, sub-amostra, tempo de incubação da prova de presunção e prova de confirmação respectiva

Dia	Local de amostragem	Sub-amostra	Prova de presunção		Prova de confirmação	
			até 24 h (1)	até 48 h (2)	a partir de (1)	a partir de (2)
1. <sup>º</sup>	S1	R	A 430	930	430	430
		B	430	930	230	230
	S2	F	A 2400	2400	2400	2400
		B	1500	1500	930	930
	S3	R	A 1500	1500	930	930
		B	2400	2400	930	930
	S4	F	A 930	1500	930	1500
		B	930	930	930	930
	S5	R	A 1500	2100	750	750
		B	430	930	430	430
	S6	F	A 930	2400	930	930
		B	750	1500	430	430
2. <sup>º</sup>	S1	R	A 1500	4600	750	750
		B	930	2100	390	390
	S2	R	A 4600	4600	1500	1500
		B	4600	4600	2400	2400
	S3	F	A 230	430	230	430
		B	2400	2400	930	2400
	S4	R	A 430	430	230	93
		B	230	230	93	93
	S5	F	A 430	430	150	150
		B	150	430	150	150
	S6	R	A 2400	4600	230	230
		B	930	930	230	230
3. <sup>º</sup>	S1	R	A 750	750	230	230
		B	430	930	120	120
	S2	F	A 150	750	150	150
		B	930	11000	210	210
	S3	R	A 11000	11000	4600	11000
		B	4600	4600	2400	2400
	S4	F	A 2400	2400	930	2400
		B	2400	2400	930	930
	S5	R	A 430	430	230	230
		B	930	930	430	430
	S6	F	A 2400	2400	930	930
		B	930	930	4600	4600

**QUADRO V**

**N. M. P. de bactérias coliformes, por 100 ml, das águas das praias de São Vicente, por dia, local de amostragem, sub-amostra, tempo de incubação da prova de presunção e prova de confirmação respectiva**

Dia	Local de amostragem	Sub-amostra	Prova de presunção		Prova de confirmação			
			até 24 h (1)	até 48 h (2)	a partir de (1)	a partir de (2)		
1.º	V1	R	A	750	4600	230	230	
			B	2400	2400	430	430	
		F	A	750	1500	430	430	
			B	930	2400	430	430	
		R	A	2400	2400	2400	2400	
			B	930	2400	230	430	
		V2	F	A	930	930	230	230
1.º	V3	R	B	1500	1500	750	750	
			A	1500	2400	930	930	
		F	B	210	2400	150	430	
			A	930	930	430	430	
		R	B	1500	1500	750	750	
			A	430	4600	430	930	
		V4	F	A	2400	2400	430	930
1.º	V5	R	B	750	11000	430	430	
			A	230	930	230	430	
		F	B	230	430	93	230	
			A	230	930	230	230	
		R	B	430	930	93	430	
			A	430	930	430	430	
		V6	F	A	230	930	230	430
2.º	V7	R	B	150	2400	93	150	
			A	930	930	930	930	
		F	B	2400	2400	430	430	
			A	930	1500	93	93	
		R	B	430	1500	230	430	
			A	930	930	930	930	
		V1	R	B	930	1500	430	930
2.º	V2	F	A	930	930	930	930	
			B	430	930	430	430	
		R	A	230	430	230	230	
			B	930	2400	930	930	
		V3	F	A	150	150	150	150
			B	930	2400	930	930	
			A	150	750	430	430	
2.º	V4	R	B	430	930	430	930	
			A	930	930	930	930	
		F	A	230	230	230	230	
			B	430	930	430	430	
		R	A	43	93	23	43	
			B	150	430	39	75	
		V5	F	A	430	430	93	93
2.º	V6		B	75	150	43	93	
		R	A	930	930	230	230	
			B	430	430	150	150	
		F	A	430	2400	230	230	
			B	230	430	230	230	
		R	A	930	2400	150	430	
			B	430	930	930	1500	
3.º	V7	R	A	430	930	430	430	
			B	430	430	430	430	
		F	A	230	230	43	93	
			B	93	230	93	93	
		V1	R	A	11000	11000	11000	11000
			B	4600	4600	4600	4600	
		V2	F	A	2400	2400	2400	2400
3.º	V3		B	2400	4600	930	2400	
		R	A	4600	11000	4600	11000	
			B	4600	11000	4600	4600	
		V4	F	A	210	930	150	430
			B	1500	4600	93	93	
		R	A	430	2400	230	230	
			B	930	930	430	430	
3.º	V5	F	A	430	430	93	93	
			B	230	230	93	93	
		R	A	150	930	43	93	
			B	93	230	93	93	
		F	A	230	430	43	93	
			B	150	930	23	43	
		V6	R	A	93	230	93	93
3.º	V7	F	B	430	1500	23	43	
			A	430	1500	93	93	
		R	A	> 11000	> 11000	> 11000	> 11000	
			B	> 11000	> 11000	> 11000	> 11000	
		V5	R	A	> 11000	> 11000	> 11000	> 11000
			B	11000	11000	11000	11000	
		V6	F	A	11000	11000	11000	11000

## QUADRO VI

N. M. P. de bactérias coliformes, por 100 ml, das águas da Praia Grande, por dia, local de amostragem, sub-amostra, tempo de incubação da prova de presunção e prova de confirmação respectiva

Dia	Local de amostragem	Sub-amostra	Prova de presunção		Prova de confirmação	
			até 24 h (1)	até 48 h (2)	a partir de (1)	a partir de (2)
1.º	G1	R	230	430	91	91
		B	930	930	230	230
	G2	F	91	91	36	36
		A	73	150	30	30
	G3	R	30	30	30	30
		B	230	230	36	91
	G4	F	36	91	<	30
		A	91	91	36	36
	G5	R	430	430	230	430
		B	91	91	91	91
2.º	G6	R	230	230	230	230
		B	150	150	91	91
	G7	F	23	23	9,1	23
		A	23	23	9,1	9,1
	G8	R	43	43	3,6	3,6
		B	23	23	9,1	9,1
	G9	F	9,1	23	<	3
		A	23	23	3	3
	G10	R	9,1	23	7,3	7,3
		B	23	23	3,6	3,6
	G1	F	23	43	7,3	7,3
		A	9,1	23	3,6	9,1
	G2	R	9,1	150	3,6	3,6
		B	9,1	93	3,6	3,6
	G3	F	43	43	<	7,3
		A	3,6	43	3	9,1
	G4	R	9,1	23	3,6	9,1
		B	23	23	3,6	3,6
	G5	F	23	43	3,6	3,6
		A	23	43	3,6	3,6
	G6	R	9,1	23	3,6	9,1
		B	23	23	3,6	3,6
	G7	F	9,1	23	3,6	9,1
		A	23	23	3,6	9,1
	G8	R	9,1	39	<	3
		B	23	75	9,1	23
	G9	F	14	75	3,6	9,1
		A	43	93	3,6	3,6
	G10	R	9,1	43	3,6	3,6
		B	23	43	3,6	9,1
	G1	F	23	75	23	23
		A	43	75	9,1	15
	G2	R	> 110000	> 110000	> 110000	> 110000
		B	> 110000	> 110000	> 110000	> 110000
	G3	R	> 110000	> 110000	110000	110000
		B	> 110000	> 110000	46000	110000
	G4	R	> 110000	> 110000	24000	24000
		B	> 110000	> 110000	24000	24000
	G5	F	> 110000	> 110000	46000	46000
		A	> 110000	> 110000	46000	46000
	G6	R	11000	11000	11000	11000
		B	11000	11000	11000	11000
	G7	F	11000	11000	11000	11000
		A	4600	4600	4600	4600
	G8	R	4600	4600	4600	4600
		B	4600	4600	4600	4600
	G9	F	930	930	930	930
		A	930	930	930	930
	G10	R	230	430	230	230
		B	750	2400	750	750
	G1	F	750	4600	750	750
		A	930	2400	930	930
	G2	R	390	750	390	390
		B	230	230	230	230
	G3	F	230	430	230	230
		A	430	430	430	430
	G4	R	230	230	230	230
		B	230	230	230	230

QUADRO VI (Continuação)

Dia	Local de amostragem	Sub-amostra	Prova de presunção		Prova de confirmação	
			até 24 h (1)	até 48 h (2)	a partir de (1)	a partir de (2)
2. <sup>o</sup> (cont.)	G9	R	A 230	230	230	230
			B 430	930	430	430
	G10	F	A 930	930	430	430
			B 230	430	230	230
3. <sup>o</sup>	G1	R	A 230	930	36	91
			B 230	430	36	91
	G2	F	A 930	930	110	210
			B 150	2300	73	73
	G3	R	A 430	430	< 30	30
			B 930	930	36	91
	G4	F	A 430	930	30	230
			B 930	930	230	230
G5	G5	R	A 230	430	< 30	30
			B 230	430	36	36
	G6	F	A 73	430	< 30	30
			B 430	430	36	36
	G7	R	A 23	230	23	23
			B 43	93	9,1	23
	G8	F	A 150	930	43	93
			B 43	430	43	43
	G9	R	A 43	430	23	23
			B 230	430	43	43
G10	F	R	A 23	150	9,1	9,1
			B 93	430	23	23
	G10	R	A 43	230	43	43
			B 23	230	23	23
	F	R	A 43	230	43	43
			B 23	93	23	23
	R	F	A 43	150	93	93
			B 150	430	75	75
	F	R	A 75	430	9,1	9,1
			B 43	93	43	43
	R	F	A 43	430	23	23
			B 230	430	43	43

O quadro VIII apresenta os resultados de tal estudo, para os valores obtidos nas várias praias, achando-se os da Praia Grande ainda divididos em dois grupos de locais de amostragem, 1 a 5 e 6 a 10. Acham-se tabelados os valores da relação percentual mediana entre os N. M. P. da confirmação da prova de presunção às 24 h e os N. M. P. desta última; entre os N. M. P. da confirmação da prova de presunção às 48 h e os da prova de presunção às 24 h; e o intervalo de confiança de tais valores no nível de 5%. Além disso, no mesmo quadro, se encontram as percentagens de concordância entre os valores da prova de confirmação e os da prova de presunção, nas mesmas condições anteriores, e também o intervalo de confiança ao nível de 5%, dessas mesmas percentagens.

A observação das percentagens de concordância nas várias praias revela valores desde 17,2 até 49,4. Poderia haver pequena percentagem de valores iguais em ambas as provas e os casos de discordância serem todos de pequena intensidade. A observação das percentagens medianas dos valores da prova de confirmação sobre os de presunção mostram, porém, que tal não deve ser o caso. Chama a atenção o fato dos intervalos de confiança destas percentagens medianas serem muito amplos. Isso, porém, é consequência natural do número limitado de valores diferentes que podem ocorrer com o número de tubos empregados por diluição.

QUADRO VII

Médias aritmética e geométrica dos N. M. P. de bactérias coliformes, por 100 ml, nas águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande e índices correspondentes (\*), por tempo de incubação e prova de confirmação respectiva.

Praia	Local de amostragem	Média (**)	Prova de presunção positiva				Prova de confirmação positiva			
			Até 24 h (1)		Até 48 h (2)		A partir de (1)		A partir de (2)	
			n.º absoluto	índice	n.º absoluto	índice	n.º absoluto	índice	n.º absoluto	índice
Santos	todos	A G	1 450 880	141 149	2 190 1 430	213 242	790 490	77 83	1 030 590	100 100
S. Vicente	todos	A G	1 610 660	107 138	2 480 1 240	165 258	1 230 350	82 73	1 500 480	100 100
Praia Grande	1 a 5	A G	18 030 660	101 200	19 890 1 000	111 303	15 760 250	88 76	17 920 330	100 100
	6 a 10	A G	180 74	120 168	420 196	280 445	150 38	100 86	150 44	100 100
	todos	A G	9 100 221	101 184	10 160 442	112 368	7 960 97	88 81	9 040 120	100 100

(\*) — Índices que se obtêm atribuindo-se o valor 100 às médias dos N. M. P. resultantes da confirmação das provas de presunção positivas até 48 h.

(\*\*) — A = aritmética; G = geométrica.

## QUADRO VIII

**Estudo da relação entre os valores dos N. M. P. obtidos na prova de confirmação e os da prova de presunção, nas águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande.**

Praia	Relação das provas	Locais de amostragem	Relação percentual mediana entre valores de confirmação e presunção				Concordância entre valores de confirmação e presunção		
			Mediana (m)	Intervalo de confiança de (m) ao nível de 5%		Percentagem de concordância (p)	Intervalo de confiança de (p) ao nível de 5%		
				superior	inferior		superior	inferior	
Santos	C24/P24 (*)	todos	52,2	53,5	46,2	30,6	41,1	20,0	
	C48/P48 (**)	todos	46,2	53,5	34,9	26,4	36,4	16,4	
	C48/P24 (***)	todos	59,6	100	46,2	41,7	53,1	30,3	
São Vicente	C24/P24 (*)	todos	57,3	100	51,1	42,9	53,4	32,3	
	C48/P48 (**)	todos	46,2	51,0	33,0	25,0	34,2	15,8	
	C48/P24 (***)	todos	100	100	62,0	49,4	60,1	38,7	
Praia Grande	C24/P24 (*)	1 a 5 6 a 10	39,6 67,8	100 100	24,7 40,4	38,3 48,2	52,2 61,3	24,4 35,1	
	C48/P48 (**)	1 a 5 6 a 10	28,7 23,6	100 40,4	21,1 18,7	38,3 17,2	52,2 26,9	24,4 8,5	
	C48/P24 (***)	1 a 5 6 a 10	53,5 80,6	100 100	39,6 49,9	40,4 43,1	56,4 55,8	26,4 30,4	

(\*) — Confirmação da prova de presunção positiva às 24 h em relação à prova de presunção positiva às 24 h.

(\*\*) — Confirmação da prova de presunção positiva às 48 h em relação à prova de presunção positiva às 48 h.

## CONCLUSÃO

Os resultados dêste estudo mostram, assim, ser de todo conveniente se submeterem os exames das águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande à prova de confirmação. Em relação a esta última praia, aliás, a nova situação criada pela atual cloração dos esgotos lançados na enseada do Itaipu, inexistente na ocasião em que se fêz este trabalho, passou a exigir realmente o poder bacteriostático seletivo dos meios confirmatórios. Acresce a essas razões o fato da atual legislação sanitária estadual (3) ter adotado, para a amostragem e análises necessárias ao controle das águas, os métodos da Associação Americana de Saúde Pública. A última edição desses métodos padrões norte-americanos — publicada após a parte experimental desta investigação já estar realizada — modificou os critérios da seleção de provas no exame dos vários tipos de águas, e passou a recomendar a prova de confirmação na determinação da balneabilidade das águas naturais. A submissão dos exames das águas das praias estudadas à prova de confirmação passou, pois, a ter recomendação legal. Este estudo comprova a justeza de tal recomendação, no que se refere às águas marítimas investigadas.

## RESUMO

Em vista do poder bactericida da água do mar e da maior resistência das bactérias esporuladas, a "prova de presunção" da análise bacteriológica para a pesquisa de coliformes poderia apresentar maior percentagem de resultados falsos no exame de água do mar, do que a encontrada comumente nas águas doces. Dada a inexistência de informação sobre a questão, os autores realizaram o presente estudo, a fim de averiguar a especificidade de tal prova no exame das águas das praias de Santos, São Vicente e Praia Grande.

De cada amostra, examinaram-se duas sub-amostras A e B, empregando-se duas séries iguais de quatro "diluições" decimais e de cada "diluição" inocularam-se três tubos de caldo lactosado. Contando-se as sub-amostras, foram realizados 276 exames — 72 da praia de Santos, 84 das praias de São Vicente e 120 da Praia Grande. Ao todo, foi examinado o total de 3 312 porções, das quais 1834, 55,4%, foram positivas às 24 h de incubação e 228, 6,9%, se positivaram nas segundas 24 h, elevando o total presumivamente positivo para 2 062, ou 62,3%. Todos os resultados positivos foram submetidos à prova de confirmação, em caldo-bile-lactose-verde-brilhante. Foram confirmados 50,4% do total examinado, ou 80,9% das positivas na prova de presunção. Nas águas doces, a percentagem mais freqüentemente confirmada costuma ser de 90% ou mais.

Quando se faz o exame sómente pela "prova de presunção", mais comumente se consideram apenas os resultados obtidos às 24 h. O número total de porções confirmadas correspondeu a 90,9% das porções presumivamente positivas no fim dêsse período. Este achado levaria à decisão de não ser compensador o emprêgo da "prova de confirmação" no exame das águas em questão. Porém, sendo êste método de avaliação sujeito a êrro, os resultados foram examinados também em térmos dos "números mais prováveis", determinados para cada exame. Por êste processo, a conclusão se modifica, porquanto, através da média geométrica dos N. M. P., se teriam encontrado, na prova de presunção lida às 24 h, resultados exagerados que variaram, em média, de 38% a 100%, nos vários grupos de locais de amostragem.

Dada a informação restrita fornecida pelas médias, quando não se leva em conta a variação dos valores, os resultados foram apreciados através de estudo da relação percentual mediana entre os valores dos N. M. P. obtidos na prova de confirmação e os da prova de presunção, e também através da percentagem de concordância entre ambos os valores. Para cada caso, foram estimados os intervalos de confiança ao nível de 5%. Os resultados obtidos confirmam a sugestão, fornecida pelas médias geométricas, de ser de todo conveniente a realização dos exames das águas das praias estudadas, através da prova de confirmação. Esta conclusão comprova, para o caso, a justeza da modificação havida na última edição dos métodos padrões norte-americanos (publicada após a parte experimental desta investigação já estar realizada), a qual passou a exigir o uso da prova de confirmação na determinação da balneabilidade das águas.

## SUMMARY

Since sea water exhibits a definite bactericidal action, the greater resistance of spore bearing bacteria might produce a larger percentage of false presumptive tests in the bacterio-

logical examination for coliforms in sea water than is commonly found in the examination of fresh water. Due to the great paucity of published data on the subject, a study was carried out to verify the specificity of the presumptive test in the examination of the beach waters from Santos, São Vicente and Praia Grande.

The examinations were made in duplicate. From each sample, two similar series of four decimal dilutions were prepared and for each dilution three tubes of lactose broth were inoculated. Taking into consideration the duplicate tests, 276 tests were performed. 72 from Santos, 84 from São Vicente and 120 from Praia Grande. A total of 3.313 quantities were examined, from which 1.834, or 55.4 per cent, were positive in the first 24 h incubation period and 228, or 6.9 per cent, in the second 24 h period, the total summing up to 2.062, or 62.3 per cent. All positive portions were submitted to the confirmation test in brilliant green lactose bile broth. From the total number of portions examined, 50.4 per cent were confirmed, corresponding to 80.9 per cent of the positive portions in the presumptive test. In fresh water the percentage most commonly confirmed is 90 per cent or better.

When only the presumptive test is employed, the 24 h results are considered most frequently. The total number of confirmed portions corresponds to 90.9 per cent of the portions that were positive in the 24 h presumptive test. This would lead to the conclusion that it would not be worth while to employ the confirmatory procedure. However, this evaluating method being subject to error, the results were analysed in terms of the most probable numbers. In this way a different conclusion is attained, for greater differences between the 24 h presumptive results and those obtained in the final confirmation are evidenced through the geometric means of the MPN values. According to these means, higher results, varying on the average from 38 to 100 per cent, would be indicated by the 24 h presumptive test for the different group of sampling points.

Due to the limited information provided by the means, when one does not take into account the values variability, the results were evaluated through the study of the median percentage ratio between the MPN values in the confirmation test and in the presumptive test, as well as through the percentage of agreement between both series of values. In each case the 95 per cent confidence interval was calculated. The results so obtained confirm the suggestion of the geometric means that the examination of the waters of all the beaches studied be made through the confirmation test. This conclusion justifies, in this case, the modification presented in the last edition of the american standard methods for the examination of water (published after the experimental part of this study had been made), which suggests that the confirmation test be applied in the examination of bathing waters.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores manifestam seu sincero reconhecimento ao Dr. Edison Galvão, assistente do Departamento de Estatística da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela valiosa análise estatística dos resultados, apresentada no quadro VIII.

#### REFERÊNCIAS

- 1 — Christovão, D. de A.: Comparação entre o caldo triptose-lauril e o caldo lactosado, na determinação do número de bactérias coliformes nas águas das praias dos municípios de Santos e São Vicente. Arq. Fac. Hig. e Saúde Pùb. 11: (1), 1957, no prelo.
- 2 — Christovão, D. de A., Azevedo Netto, J. M. & Jezler, H.: Investigação da contaminação das praias de Santos e São Vicente. Arq. Fac. Hig. e Saúde Pùb. 8: 167 — 188, 1954.
- 3 — Decreto N.<sup>o</sup> 24 806, de 25 de julho de 1955. Regulamenta as leis ns. 2 182, de 23 de julho de 1953 e 3 068, de 14 de julho de 1955.
- 4 — Glossary — Water and Sewage Control Engineering. A.P.H.A., A.S.C.E., A.W.W.A. & F.S.W.A.
- 5 — Hoskins, J. K.: Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes tests by fermentation tube method. Pub. Health Rep. 49: 393 — 405, 1934.
- 6 — Standard Methods for the Examination of Water and Sewage, 9th Ed., A.P.H.A. & A.W.W.A., New York, 1946.
- 7 — Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes, 10th Ed., A.P.H.A., A.W.W.A. & F.S.I.W.A., New York, 1955.