



NORMA TÉCNICA

L5.215

Out/1985
31 PÁGINAS

Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos: métodos de ensaio

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

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

CETESB	PROVA DE ADEQUABILIDADE BIOLÓGICA DA ÁGUA DESTILADA PARA FINS MICROBIOLÓGICOS Método de ensaio	L5,215 OUT/1985 1ª Revisão
--------	--	----------------------------------

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO.....	1
1 OBJETIVO.....	2
2 NORMAS COMPLEMENTARES.....	3
3 DEFINIÇÕES.....	3
4 APARELHAGEM.....	3
5 EXECUÇÃO DO ENSAIO.....	12
6 RESULTADOS.....	18
ANEXO A.....	24
ANEXO B.....	26
ANEXO C.....	30

INTRODUÇÃO

A qualidade da água destilada para uso em laboratório vem sendo motivo de especulação desde há muitos anos. Teoricamente, a água destilada deveria se constituir apenas de água. No entanto, isto não é obtido normalmente, devido às limitações nos métodos de produção e armazenamento. O custo por unidade de volume também limita o grau de pureza e quando pureza química ou biológica são requeridas, a escala de custo se eleva consideravelmente.

A água destilada, para uso microbiológico, deve ser livre de substâncias orgânicas e inorgânicas, sejam tóxicas ou nutritivas, que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos.

Muitos fatores podem influenciar a qualidade da água destilada, tais como o tipo de destilador, a origem da água que o abastece, as condições em que se encontram as colunas de troca iônica, quando são utilizadas, o uso de filtro de carvão, o tipo do tanque de armazenamento, a temperatura em que é mantida a água destilada produzida e o tempo de armazenamento da mesma antes do uso. A falta de controle adequado destes fatores pode contribuir para a contaminação da água destilada por diferentes substâncias, incluindo íons metálicos provenientes do sistema de destilação; hidróxido de amônio, ácido clorídrico e outros vapores produzidos no laboratório; cloro proveniente da fonte de água; e anidrido carbônico do ar.

Além da contaminação por substâncias inorgânicas ou orgânicas, pode ocorrer a contaminação por microrganismos. Análises microbiológicas de uma determinada fonte de água destilada podem, às vezes, evidenciar a presença de um grande número de Pseudomonas e Achromobacter. Estes organismos são capazes de sobreviver e de se multiplicar em condições nutritivas mínimas. O fato de Waksman ter demonstrado a ação antagonista de Pseudomonas ao crescimento de E.coli, Salmonella typhi, Serratia marcescens, Corynebacterium diphteriae, Mycobacterium tuberculosis e Vibrio cholerae, entre outras bactérias, evidencia e reforça a importância do controle da qualidade da água destilada para uso em laboratório de microbiologia. Pesquisas realizadas nesse sentido relatam também, a ocorrência de contaminação por coliformes, como resultado de uma proteção inadequada do tanque de armazenamento contra poeira e, em outros casos, demonstrou-se que a coluna de troca iônica ou filtro de carvão, usados em conjunção com um sistema de destilação, atuavam como fonte de bactérias contaminantes possibilitando, inclusive, sua multiplicação. A presença de algas contaminantes, introduzidas pelo ar, pode ocorrer particularmente nos casos em que o recipiente de vidro, com tampões de algodão mal ajustados ou sem tampões, está localizado em áreas onde há alta intensidade luminosa; sob estas condições e com o uso pouco frequente da água destilada nele armazenada, um apreciável crescimento de algas frequentemente se desenvolve dentro de poucas semanas, atuando como um fator que afeta a qualidade da água destilada, devido à produção de nutrientes orgânicos ou metabolitos tóxicos para bactérias.

Uma medida essencial para o controle da água destilada ou desmineralizada é a condutividade específica que não deve ser maior que 2 microhms/cm a 25°C e é usada para indicar a presença de íons inorgânicos de metais, bases e sais. No entanto, a medida da condutividade não permite a distinção entre a presença de íons metálicos tóxicos e não tóxicos e nada revela a respeito de qualquer contaminação orgânica que possa estar presente.

A presença de substâncias tóxicas ou nutritivas na água destilada pode ser detectada através de provas de adequabilidade biológica que comparam o desenvolvimento de Enterobacter aerogenes em um meio de cultura mínimo, preparado com a água destilada a ser testada, com o desenvolvimento do mesmo organismo em meio correspondente, preparado com água destilada de alta qualidade (controle).

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve os procedimentos utilizados para avaliar a adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar;

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;
- b) L5.201 - Contagem padrão de colônias de bactérias;
- c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.5.

3.1 Enterobacter aerogenes

Bactéria pertencente ao Grupo Coliforme. São bacilos curtos, Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis por flagelos peritríquios, que fermentam lactose com produção de gás em 24-48 h a 35°C.

3.2 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.3 Cultura pura

Cultura que contém um único tipo de microrganismo.

3.4 IMViC

Série bioquímica simplificada, utilizada para diferenciação de bactérias do grupo coliforme, na qual são incluídos testes para verificar a produção de indol, o tipo de fermentação da glicose (ácido-mista ou butileno-glicólica) e a capacidade de utilização de citrato como única fonte de carbono. A denominação IMViC é formada a partir das iniciais (em inglês) dos testes componentes desta série (I = indol; M = vermelho de metila; V = Voges Proskauer e C = citrato).

3.5 p.a.

Para análise

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à temperatura de 170 a 180°C.

4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape de vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.3 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada de preferência em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C.

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 45°C a 46°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

4.1.5 Sistema de destilação de água

Deve ser construído de um material que não contribua para contaminação da água, sendo que todas as superfícies que entram em contato com a água destilada devem ser de aço inoxidável, quartzo, vitor ou vidro pyrex. Os destiladores construídos de metal (cobre ou outros) ou ligas metálicas (latão), banhados por estanho, são os menos aconselhados pois requerem uma manutenção estrita para evitar que, nas partes mais sujeitas a desgaste, haja exposição da água ao metal de base, em decorrência da perda da camada de estanho. Deve-se evitar, de modo especial, o contato da água com materiais de cobre. O recipiente de fervura de um destilador deve ser esvaziado diariamente e, posteriormente, ser cheio com água limpa. Periodicamente, o destilador deve ser desmontado e submetido a uma limpeza completa. Os destiladores metálicos devem ter, adaptado, um sistema de drenagem constante, para evitar a formação de incrustações.

Os tanques de armazenamento devem ser de aço inoxidável, fibra de vidro ou plástico apropriado (por exemplo politetrafluoroetileno), devem ter uma tampa que se ajuste perfeitamente e um filtro na entrada de ar para remover gases e vapores. Sua limpeza completa deve ser efetuada periodicamente. As instalações de um sistema de distribuição de água destilada devem ter tubos e conexões de estanho puro, aço inoxidável, vidro pyrex ou plástico apropriado (por exemplo politetrafluoroetileno - PTFE). Observação: O cloreto de polivinila (PVC) não deve ser utilizado para esta finalidade, pois constitui uma fonte de contaminação.

Recomenda-se fazer um pré-tratamento, se a água que alimenta o destilador for de baixa qualidade (por exemplo, se contiver compostos orgânicos e apresentar valores elevados de turbidez e dureza). Uma coluna de troca iônica (catiônica e aniônica) pode ser colocada antes do destilador para abrandar águas duras e evitar a formação de incrustações no aquecedor e no condensador. Uma coluna de carvão ativado, instalada antes do destilador, serve para remover contaminantes orgânicos que são susceptíveis de serem destilados. Se for necessário remover traços de íons, deve-se instalar uma coluna de troca iônica depois do destilador.

4.1.6 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH = 4,0, pH = 6,86 e pH = 9,18.

4.1.7 Balança de topo

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.8 Balança analítica

Com sensibilidade mínima de 0,1 mg ao pesar 150 a 200 g.

4.1.9 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, com capacidade adequada para conter os meios de cultura e soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.10 Contador de colônias

Tipo Quebec ou similar, preferencialmente com campo escuro, ou outro modelo que forneça aumento equivalente (1,5 diâmetros) e possibilite visualização satisfatória das colônias de bactérias.

4.1.11 Materiais para preparação de meios de cultura e soluções

Recipientes de vidro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.1.12 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter 90 + 2 ml de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.1.13 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 5 ml e 10 ml, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel. São esterilizadas por calor seco a uma temperatura de 170 a 180°C, durante duas horas.

4.1.14 Frascos para armazenamento de soluções

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter os volumes requeridos para cada solução e com sistema adequado de vedação.

4.1.15 Frascos para as soluções da prova

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter 30 ml de solução, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.1.16 Placas de Petri

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras e bolhas de ar, com 15 mm de altura x 100 mm de diâmetro.

4.1.17 Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca e capacidade adequada para conter 12 a 15 ml de meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm).

4.1.18 Bico de Bunsen

4.1.19 Tripê

4.1.20 Tela de amianto

De tamanho 22 cm x 22 cm.

4.1.21 Alças de inoculação

De platina, platina-irídio, ou níquel-cromo, com 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm; são colocadas em cabos de metal (cabo de Kolle).

4.1.22 Estantes

De arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm.

4.2 Meios de cultura e soluções

4.2.1 Reagentes

4.2.1.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizados nesse ensaio são os seguintes reagentes necessários:

- a) Agar

- b) Agar nutriente desidratado ("nutrient agar")
- c) Agar triptona glicose extrato de levedura ("plate count agar")
- d) Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- e) Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- f) Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- g) Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- h) Dextrose
- i) Extrato de carne
- j) Extrato de levedura
- l) Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.
- m) Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.
- n) Peptona
- o) Sulfato de amônia (NH_4)₂ SO_4 p.a.
- p) Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- q) Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- r) Triptona

4.2.1.2. Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, a apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos, bem como de carboidratos inespecíficos. A alta pureza (p.a.) dos reagentes empregados é um requisito fundamental a ser observado, pois variações na composição química dos mesmos poderão interferir na sensibilidade e reprodutibilidade do teste.

4.2.2 Cultura bacteriana

4.2.2.1 Cultura de Enterobacter aerogenes, (prova IMViC--++), obtida a partir de água bruta contaminada ou esgoto.

4.2.3 Preparo de meios de cultura

4.2.3.1 Agar triptona glicose extrato de levedura ("plate count agar").

Fórmula:

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	2,5 g
Dextrose.....	1,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH final após esterilização: $7,0 \pm 0,2$

Preparo:

Pesar 23,5 g do meio desidratado "Plate Count Agar" e acrescentar 1000 ml de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 12 a 15 ml em tubos de 16 mm x 150 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

4.2.3.2 Agar nutrienteFórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH final após esterilização: 6,8 ± 0,1

Preparo:

Pesar 23,0 g do meio desidratado "Nutrient Agar" e acrescentar 100 ml de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 ml em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio ainda estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada, até que o meio se solidifique, visando obter uma superfície inclinada de 6 a 7 cm de comprimento.

4.2.4 Preparo de soluções4.2.4.1 Água de diluiçãoFórmula:

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

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,1

Preparo:

A água de diluição deve ser preparada como segue:

a) preparar a solução estoque A com a seguinte composição:

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a..... 34,0 g
Água recém-bidestilada.....1000 ml

Para esse preparo, dissolver o fosfato monopotássico em 500 ml de água recém-bidestilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,1$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

b) Preparar a solução estoque B, com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a..... 91,1 g
Água recém-bidestilada.....1000 ml

Para o preparo dessa solução, dissolver o cloreto de magnésio em um litro de água recém-bidestilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso no laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira.

c) Adicionar 1,25 ml da solução estoque A e 5 ml da solução estoque B a 1 litro de água destilada.

d) Distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a 121°C durante 15 minutos, volumes de 90 ± 2 ml.

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

4.2.4.2 Solução de citrato de sódio

Fórmula:

Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a..... 0,29 g
Água recém-bidestilada.....1000 ml

Preparo:

Pesar 0,29 g de citrato de sódio e dissolver em 500 ml de água recém-bidestilada. Homogeneizar bem, até a completa dissolução do reagente. Ferver a solução por 1 a 2 minutos e, com todos os cuidados de assepsia, transferir a solução para frascos de vidro com tampa de rosca previamente esterilizados. Armazenar em geladeira (5°C), ao abrigo da luz durante, no máximo, duas semanas.

4.2.4.3 Solução de sulfato de amôniaFórmula:

Sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,60 g
 Água recém-bidestilada.....500 ml

Preparo:

Pesar 0,60 g de sulfato de amônia e dissolver em 500 ml de água recém-bidestilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente. Ferver a solução durante 1 a 2 minutos e, com todos os cuidados de assepsia, transferi-la para frascos de vidro com tampa de rosca previamente esterilizados. Armazenar em geladeira (5°C), ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas.

4.2.4.4 Solução de vários saisFórmula:

Sulfato de magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ p.a..... 0,26 g
 Cloreto de cálcio $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ p.a..... 0,17 g
 Sulfato ferroso $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ p.a..... 0,23 g
 Cloreto de sódio (NaCl) p.a..... 2,50 g
 Água bidestilada.....500 ml

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver em 500 ml de água recém-bidestilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução dos reagentes. Ferver a solução durante 1 a 2 minutos e, com todos os cuidados de assepsia, transferi-la para frascos de vidro com tampa de rosca previamente esterilizados. Armazenar em geladeira (5°C) ao abrigo da luz, durante, no máximo, 3 dias.

NOTA: Nessa solução ocorre o desenvolvimento de uma leve turbidez após o período de 3 a 5 dias. Isso se deve à conversão do sal ferroso ao estado férrico. No caso de ser observada uma turbidez mais acentuada, a solução deve ser descartada.

Se houver a necessidade de armazenamento por períodos mais prolongados da solução de vários sais, recomenda-se que a mesma seja preparada sem o sulfato ferroso e, no momento do uso da mistura, adicionar uma quantidade adequada deste sal em solução recentemente preparada e aquecida.

4.2.4.5 Solução tampão fosfatoFórmula:

Solução estoque A (ver item 4.2.4.1)..... 1 ml
 Água recém-bidestilada.....24 ml

Preparo:

Adicionar 1 ml da solução estoque A a 24 ml de água recém-bidestilada. Ferver a solução durante 1 a 2 minutos e, com todos os cuidados de assepsia, transferi-la para um frasco de vidro com tampa de rosca previamente esterilizado. Armazenar em geladeira (5°C) ao abrigo da luz durante, no máximo, duas semanas.

NOTA: Antes da utilização da solução, verificar se não há quaisquer evidências de turbidez. Em caso afirmativo, descartar a solução.

4.2.4.6 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH.1N)Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a..... 40,0 g
Água destilada.....1000 ml

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em balão volumétrico e completar o volume para 1000 ml com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

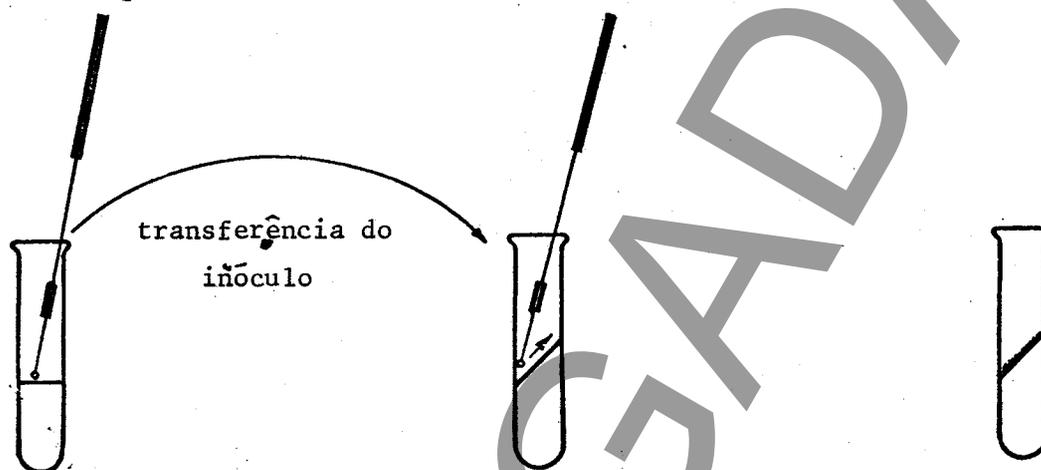
5. EXECUÇÃO DO ENSAIO5.1 Princípio do método

A prova de adequabilidade biológica da água destilada permite detectar a presença de substâncias tóxicas ou nutritivas em uma amostra de água destilada através da comparação entre a resposta de crescimento de Enterobacter aerogenes em um meio de cultura (que apresenta em sua composição concentrações mínimas de nutrientes quimicamente definidos), preparado com a água destilada em teste, e a resposta de crescimento dessa bactéria no mesmo meio de cultura, preparado com uma água de alta qualidade (controle). A presença de substâncias tóxicas ou nutritivas irá causar uma alteração da densidade de Enterobacter aerogenes após 24 horas, determinando, respectivamente, uma redução ou aumento superiores a 20% em relação ao controle.

5.2 Procedimento5.2.1 Preparação da cultura bacteriana

No dia anterior à execução da prova de adequabilidade biológica da água destilada, preparar uma cultura de Enterobacter aerogenes da seguinte forma:

5.2.1.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, colher um inóculo de uma cultura de 18-24 horas de Enterobacter aerogenes (IMViC ---++) e transferi-la para a superfície inclinada (6 a 7 cm) de agar nutriente contido em um tubo de ensaio de 16 x 150 mm. A semeadura do inóculo deve ser feita delicadamente (sem dilacerar o agar) e de forma homogênea sobre toda essa superfície (a partir da parte mais basal em direção ao topo), de modo a ser obtida uma película uniforme e contínua de crescimento após o período determinado de incubação (Figura 1).



Cultura de 18-24 h de Enterobacter aerogenes em agar nutriente.

Início e direção da semeadura do inóculo em agar nutriente inclinado.

Inóculo já distribuído em toda superfície inclinada do agar nutriente.

Figura 1: Semeadura de um inóculo de Enterobacter aerogenes em agar nutriente inclinado.

5.2.1.2 Após a inoculação, incubar o tubo contendo o agar nutriente inclinado a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 18-24 horas.

5.2.1.3 Após o período de incubação e utilizando uma pipeta esterilizada, transferir 1 a 2 ml de água de diluição tamponada (de um frasco contendo 90 ± 2 ml) sobre a película de crescimento de Enterobacter aerogenes em agar nutriente inclinado.

5.2.1.4 Com a mesma pipeta, homogeneizar a cultura, tomando cuidado para não danificar o meio.

5.2.1.5 Ainda com a mesma pipeta, transferir toda a suspensão bacteriana do tubo para o frasco de água de diluição original (item 5.2.1.3). Prepara-se assim a amostra original contendo Enterobacter aerogenes, a partir da qual serão pre-

paradas as diluições requeridas para o teste (figura 2).

5.2.1.6 Homogeneizar essa amostra original, por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço) e agitando vigorosamente; repetir a operação no mínimo 25 vezes.

5.2.1.7 Com uma pinça esterilizada de 10 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 ml da amostra original para um frasco contendo 90 ± 2 ml de água de diluição tamponada, antecipadamente identificado. Prepara-se, assim, a 1ª diluição decimal (10^{-1}).

5.2.1.8 Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição (10^{-1}) como em 5.2.1.6 e, com uma pipeta esterilizada, transferir 10 ml para um frasco contendo 90 ± 2 ml de água de diluição tamponada, conseguindo-se, assim, a 2ª diluição decimal (10^{-2}).

5.2.1.9 Proceder dessa maneira na sequência de diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), até se obter uma determinada diluição decimal (usualmente 10^{-5}), a partir da qual 1 ml diluído em 30 ml irá fornecer a densidade de 30 a 80 células viáveis de Enterobacter aerogenes por ml.

NOTA: É fundamental, para a realização da prova, que sejam efetuados testes preliminares para seleção da diluição a partir da qual 1 ml diluído em 30 ml irá fornecer contagens entre 30 a 80 células viáveis por ml da solução. O conhecimento prévio do número de microrganismos presentes em cada diluição permite estabelecer numericamente a variação que pode ocorrer entre cêpas de um mesmo microrganismo, meios de cultura, técnicas de laboratório e área de superfície do agar inclinado. Para se determinar a densidade bacteriana inocular uma série de diluições da suspensão em teste em placas (método "Pour Plate") e realizar as contagens de colônias de bactérias. Se o procedimento estiver bem padronizado, é possível reproduzir os resultados com a mesma cultura de bactéria.

5.2.2 Preparação da amostra de água destilada

5.2.2.1 Com auxílio de uma proveta estéril, coletar 150 a 200 ml de água destilada a ser testada (amostra-teste) e transferir para um frasco de vidro neutro (borossilicato ou pyrex), previamente esterilizado.

5.2.2.2 Coletar, conforme item 5.2.2.1, a amostra de água bidestilada, conheci

da como sendo de alta qualidade, a qual servirá de controle.

5.2.2.3 Ferver as amostras teste e controle durante 1 a 2 minutos, para que se jam destruídas as células vegetativas presentes. Não ferver as amostras durante períodos prolongados, pois poderá ocorrer alteração da composição química das mesmas.

5.2.3 Realização da prova

5.2.3.1 Identificar como A, B, C, D e E cinco frascos de vidro (borossilicato ou pyrex), com tampas rosqueadas e capacidade adequada (ver item 4.1.15), previamente esterilizados.

5.2.3.2 Com auxílio de pipetas estêreis de volume adequado, específicas para cada solução, adicionar aos frascos A, B, C, D e E as soluções conforme esquema abaixo:

FRASCOS SOLUÇÕES	A Controle	B Água Destilada em teste	C Nutrientes disponíveis	D Fonte de nitrogênio	E Fonte de carbono
Solução de citrato de sódio	2,5 ml	2,5 ml	-	2,5 ml	-
Solução de sulfato de amônia	2,5 ml	2,5 ml	-	-	2,5 ml
Solução de vários sais	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Solução tampão fosfato	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Água destilada em teste	-	21,0 ml	21,0 ml	21,0 ml	21,0 ml
Água bidestilada (controle)	21,0 ml	-	5,0 ml	2,5 ml	2,5 ml
Volume total	30,0 ml	30,0 ml	30,0 ml	30,0 ml	30,0 ml

5.2.3.3 Homogeneizar a diluição previamente definida, adequada para fornecer uma contagem de 30 a 80 células viáveis de Enterobacter aerogenes por ml quando 1 ml da mesma é diluído em 30 ml da solução (ver item 5.2.1.9)

5.2.3.4 Com uma pipeta esterilizada de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml dessa diluição da suspensão de Enterobacter aerogenes para cada um dos frascos A, B, C, D e E.

5.2.3.5 Preparar 5 grupos de 3 placas de Petri estêreis e proceder à sua identificação como: A, B, C, D e E.

5.2.3.6 Homogeneizar o conteúdo de cada um dos frascos A, B, C, D e E como em 5.2.1.6.

5.2.3.7 Com uma pipeta esterilizada de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da solução do frasco A para cada uma das três placas correspondentes a esse frasco. Repetir a mesma operação para os frascos B, C, D e E.

5.2.3.8 Adicionar a cada placa 12 a 15 ml de agar triptona glicose extrato de levedura, previamente fundido e estabilizado em banho-maria à temperatura de 44 a 46°C, tomando cuidado de flambar a boca do tubo antes de verter o meio de cultura na placa.

5.2.3.9 Homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contido em cada placa, com movimentos circulares em forma de oito (∞), aproximadamente dez vezes consecutivas, tomando cuidado para não projetar o meio de cultura com o inóculo contra as paredes ou a tampa das placas.

5.2.3.10 Após solidificação do meio de cultura, incubar os conjuntos A, B, C, D, e E das placas em triplicata a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 horas. As placas devem ser incubadas em posição invertida para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio de cultura. Incubar também os frascos, durante esse mesmo período e à mesma temperatura.

5.2.3.11 Após o período de incubação, proceder da seguinte forma:

a) em relação às placas

Com auxílio de um contador de colônias Quebec ou similar, efetuar a contagem de colônias em cada uma das 3 placas correspondentes a cada frasco A, B, C, D e E. Calcular a média aritmética entre as contagens de cada um desses grupos de 3 placas.

Observação: essas contagens devem estar entre 30 a 80 colônias de Enterobacter aerogenes e as médias aritméticas das contagens de cada grupo devem ser muito próximas entre si. Isto é fundamental para a precisão do teste, pois corresponde ao número de células de Enterobacter aerogenes inicialmente presentes em cada um dos frascos A, B, C, D e E, cujo crescimento será testado frente às diferentes condições fornecidas pelas soluções presentes nesses frascos.

cos. Se densidades significativamente diferentes são introduzidas nesses frascos, haverá interferências no resultado final do teste. Nesse sentido, se resultados não similares forem obtidos nessa fase inicial, é necessário recomeçar o teste, verificando todos os possíveis fatores que podem afetar a precisão dos resultados iniciais. Se forem observados todos os cuidados requeridos, a média das contagens será praticamente semelhante para os grupos A, B, C, D e E.

b) em relação aos frascos A, B, C, D e E

Para cada um dos frascos preparar, para determinação da densidade final de Enterobacter aerogenes, uma série de diluições decimais das soluções neles contidas, procedendo da seguinte forma:

- . proceder a marcação de frascos contendo 90 ± 2 ml de água de diluição estéril, anotando a letra correspondente ao 1º frasco(A), e a diluição que deverá conter (10^{-1} , 10^{-2}ou 10^{-5});
- . homogeneizar a solução contida no frasco A e, obedecendo aos cuidados de assepsia e utilizando uma pipeta esterilizada de 10 ml, transferir 10 ml dessa solução para o frasco de água de diluição previamente identificado. Prepara-se assim a primeira diluição decimal (10^{-1}).
- . repetir a operação do item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e utilizando uma pipeta esterilizada de 10 ml, transferir 10 ml dessa diluição para um novo frasco, previamente identificado. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2});
- . proceder dessa maneira na sequência de diluições requeridas (usualmente até 10^{-5}), sempre transferindo 10 ml da diluição preparada para um novo frasco contendo 90 ± 2 ml de água de diluição.
- . repetir a sequência de operações descritas neste item (b) para o preparo das diluições das soluções contidas nos frascos B, C, D e E.

5.2.3.12 Após o preparo das diluições, homogeneizar as soluções contidas nos frascos A a E e as respectivas diluições, conforme item 5.2.1.6.

5.2.3.13 Obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da solução contida no frasco A para cada uma de 3 placas de Petri estéreis. Repetir a operação para as diluições decimais preparadas a partir da solução desse frasco.

5.2.3.14 Repetir a operação do ítem anterior para as soluções dos frascos B, C, D e E e suas respectivas diluições,

5.2.3.15 Após terem sido efetuadas todas as inoculações, proceder conforme descrito nos ítems 5.2.3.8 e 5.2.3.9.

5.2.3.16 Após a solidificação do meio de cultura, incubar as placas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h, em posição invertida para evitar a condensação de água sobre a superfície do agar.

5.2.3.17 Após o período de incubação e com auxílio de um contador de colônias tipo Quebec ou similar, efetuar a leitura das placas em triplicata, selecionando para a leitura as placas correspondentes aos volumes que fornecerem contagens entre 30 e 300 colônias.

6. RESULTADOS

6.1 Cálculos

A qualidade da água destilada é determinada a partir dos seguintes cálculos:

6.1.1 Para determinar a presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano na água destilada em teste, calcula-se a razão entre o número de colônias por ml do frasco B e número de colônias por ml do frasco A, ou seja:

$$\text{razão: } \frac{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO B}}{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO A}}$$

6.1.2 Para determinar presença, na água destilada em teste, de fontes de nitrogênio e carbono, que promovem o crescimento bacteriano, calcula-se a razão entre o número de colônias por ml do frasco C e número de colônias por ml do frasco A, ou seja:

$$\text{razão: } \frac{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO C}}{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO A}}$$

6.1.3 Para determinar a presença, na água destilada em teste, de fontes de nitrogênio, que promovem o crescimento bacteriano, calcula-se a razão entre o número de colônias por ml do frasco D e o número de colônias por ml do frasco A, ou seja:

$$\text{razão: } \frac{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO D}}{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO A}}$$

6.1.4 Para determinar a presença, na água destilada em teste, de fontes de carbono, que promovem o crescimento bacteriano, calcula-se a razão entre o número de colônias por ml do frasco E e o número de colônias por ml do frasco A, ou seja:

$$\text{razão: } \frac{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO E}}{\text{contagem de colônias/ml-FRASCO A}}$$

6.2 Interpretação dos resultados

6.2.1 Para a determinação da presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano na água destilada em teste, considerar o exposto nos itens 6.2.1.1 a 6.2.1.5.

6.2.1.1 Quando a razão B/A assumir valores compreendidos no intervalo entre 0,8 e 1,2 (inclusive), isso indica ausência de substâncias tóxicas inibidoras do crescimento bacteriano, na amostra de água destilada em teste.

6.2.1.2 Quando a razão B/A assumir valores inferiores a 0,8, isso indica a existência de substâncias tóxicas inibidoras do crescimento bacteriano na amostra de água destilada em teste. Este valor já inclui todas as tolerâncias permissíveis.

6.2.1.3 Quando a razão B/A assumir valores superiores a 1,2, isso indica a existência de substâncias nutritivas estimuladoras do crescimento bacteriano na amostra de água destilada em teste. No entanto, devido à sensibilidade da prova, razões de até 3,0 são aceitáveis na prática.

6.2.1.4 Quando a razão B/A estiver entre 1,2 e 3,0, os ensaios C, D e E não serão necessários, exceto em circunstâncias especiais.

6.2.1.5 Quando a razão B/A indicar reações tóxicas, isto é, assumir valores inferiores a 0,8, não é necessário calcular as razões C/A, D/A e E/A.

6.2.2 Para a determinação da presença de substâncias estimuladoras do crescimento bacteriano na água destilada em teste, considerar o exposto nos itens 6.2.2.1 a 6.2.2.4.

6.2.2.1 As quantidades de nitrogênio e carbono orgânico, presentes no frasco A, são fatores limitantes do crescimento bacteriano;

6.2.2.2 Quando a razão B/A assumir valores entre 0,8 e 1,2, a razão B/A será muito baixa e as razões D/A e E/A terão valores inferiores a 1,2;

6.2.2.3 Uma quantidade muito grande de nitrogênio amoniacal, na ausência de carbono orgânico, pode aumentar a razão dos frascos D/A para valores superiores a 1,2, caso a razão B/A esteja entre 0,8 e 1,2;

6.2.2.4 Uma alta concentração de carbono, com ausência de nitrogênio, pode aumentar a razão dos frascos E/A para valores superiores a 1,2, caso a razão B/A esteja entre 0,8 e 1,2.

7. TESTES ADICIONAIS PARA CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA DESTILADA

Na tabela abaixo são relacionados os testes adicionais recomendados para controle da água destilada usada em laboratório de microbiologia, bem como os limites permissíveis para cada um deles e a periodicidade recomendada para sua realização.

Parâmetros/Unidades		Limites permissíveis	Frequência de monitoramento
Testes Microbiológicos			
Contagem de bactérias heterotróficas em placas (UFC/ml)	Água recém-destilada	< 1000	mensal
	Água destilada estocada	< 10000	mensal
Prova de adequabilidade biológicas da água destilada - razão B/A		0,8-3,0	anual*
Testes Químicos			
Condutividade unhos/cm a 25°C		1-2	diário
pH		5,5-7,5	diário
Carbono orgânico total (mg/l)		< 1,0	mensal
Amônia/Aminas (mg/l)		< 0,1	mensal
Cloro residual		ausente	mensal
Metais pesados (mg/l)	Cádmio	< 0,05	mensal
	Chumbo	< 0,05	
	Cobre	< 0,05	
	Cromo	< 0,05	
	Níquel	< 0,05	
	Zinco	< 0,05	
	Total	< 1,0	

* Nota: anual ou quando da aquisição de novo destilador.

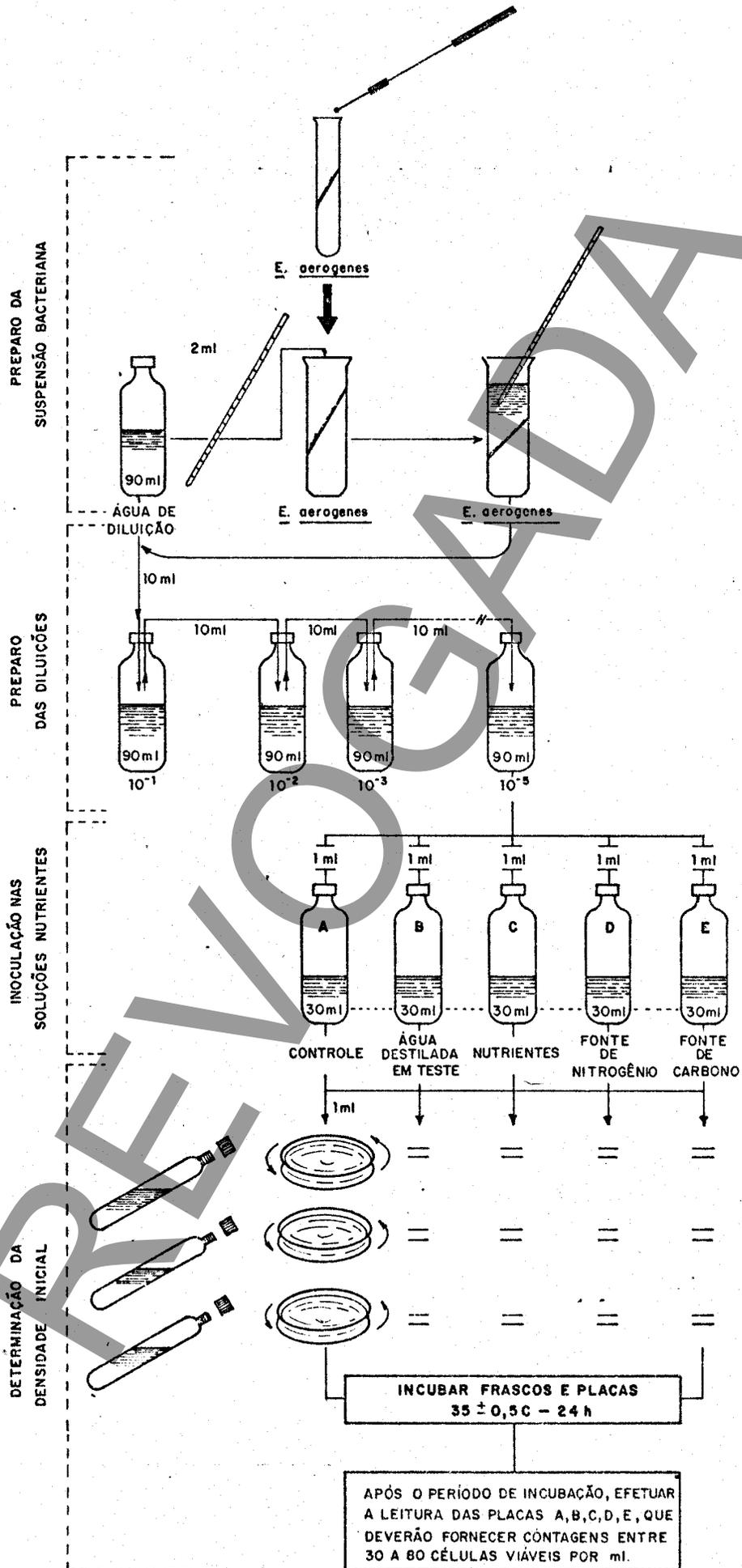
Em relação à contaminação da água destilada por traços de certos elementos, testes efetuados têm evidenciado a superioridade de destiladores de vidro quando comparados com os de metal. A tabela abaixo reproduz os valores de concentração de traços de elementos (obtidos através da análise espectrográfica), em águas destiladas armazenadas em reservatórios de vidro e de metal, obtidos em teste comparativo.

Elementos e Concentração (microgramas/ℓ)

	Zn	B	Fe	Mn	Al	Cu	Ni	Pb
Reservatório de vidro	<1	12	1	<1	<5	5	<2	<2
Reservatório de Metal	9	13	2	<1	<5	11	<2	26

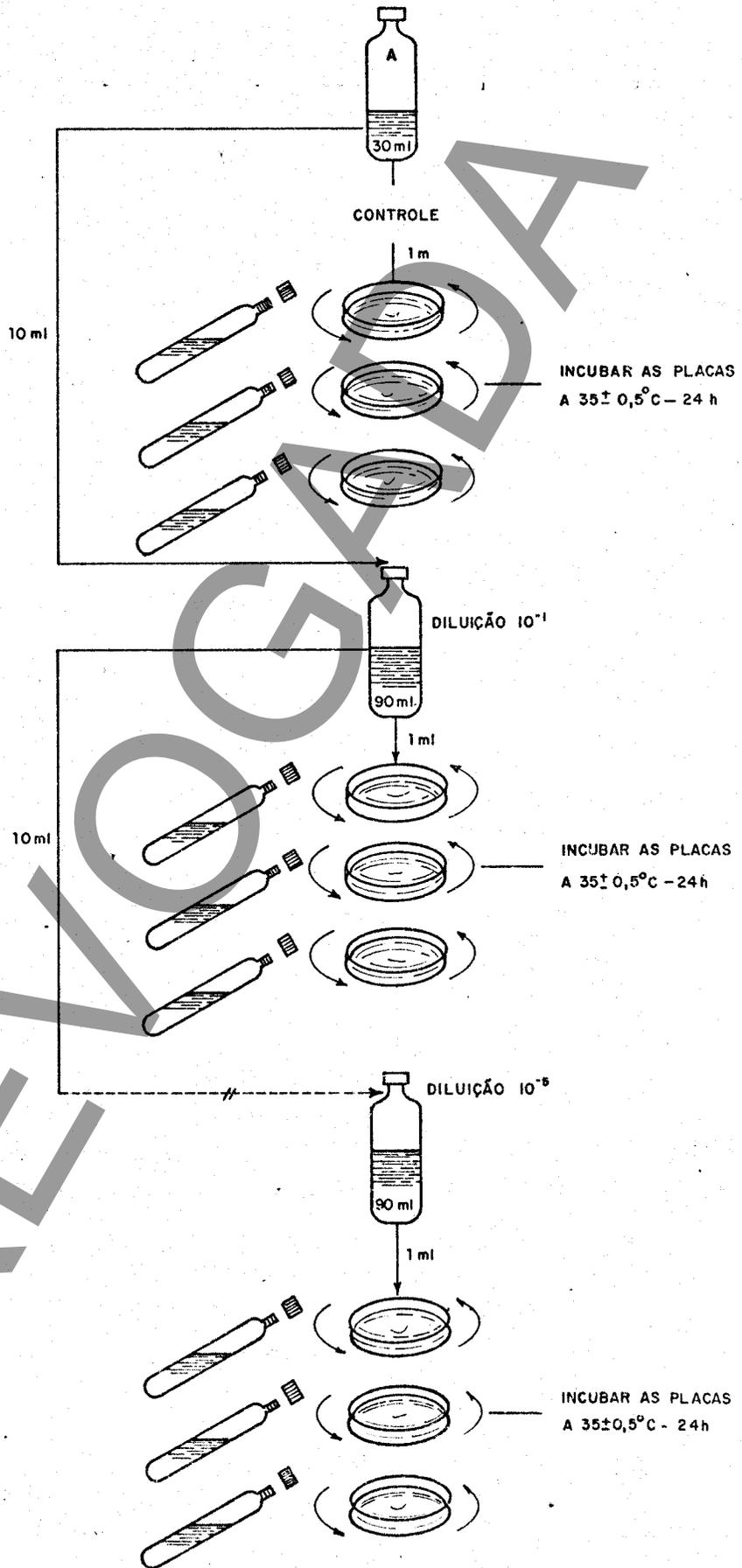
Verifica-se que a água destilada armazenada no reservatório de vidro apresenta uma contaminação por zinco, cobre e chumbo substancialmente menor do que a apresentada pela água armazenada no reservatório de metal. Estes testes, realizados com certa frequência, têm mostrado que essa relação se mantém constante, com raras exceções.

FIG. 2-ESQUEMA DE PROCEDIMENTO
1ª PARTE



2ª PARTE

APÓS 24h. A $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ EFETUAR DILUIÇÕES DAS SOLUÇÕES DOS FRASCOS A, B, C, D e E



REPETIR A MESMA SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTO PARA OS FRASCOS B, C, D e E

ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE A PROVA DE ADEQUABILIDADE DA ÁGUA DESTILADA

A-1 Dificuldades na execução da prova

Esta prova é de extrema sensibilidade e requer a tomada de uma série de cuidados especiais para a obtenção de resultados significativos. Usualmente, as dificuldades no procedimento estão associadas aos seguintes fatores:

- . Armazenamento da água destilada em frascos de vidro comum ou frascos de vidro sem fechamento hermético;
- . Uso de produtos químicos de grau não analítico ou de fabricação não recente, para a preparação das soluções. Isto é particularmente importante na preparação da solução de tampão fosfato, visto que alguns lotes de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) apresentam quantidades significativas de impurezas químicas;
- . Contaminação dos reagentes com água destilada de má qualidade, apresentando uma densidade bacteriana elevada. Para evitar isso, é aconselhável o emprego de água bidestilada ou desmineralizada de alta qualidade para o preparo das soluções, e a realização de uma contagem padrão de bactérias de cada uma destas soluções, antes de sua utilização na prova de adequabilidade, para checar se as mesmas não estão contaminadas;
- . Demora na inoculação das placas, para determinação das densidades inicial e final de Enterobacter aerogenes (técnica de "pour plate");
- . Incubação muito prolongada das placas (por mais de 26 horas), que diminui a sensibilidade da resposta de crescimento;
- . Falha na obtenção da densidade inicial desejada de Enterobacter aerogenes e escolha incorreta da diluição usada para obter a contagem dessa bactéria após 24 horas;
- . Lavagem da vidraria, empregada na prova, feita de maneira inadequada. A sensibilidade do teste e a reprodutibilidade de resultados dependem, em parte da limpeza da vidraria empregada no teste (frascos, tubos, pipetas, etc.). Toda vidraria deve ser de borossilicato e, após a lavagem da mesma, deve se efetuar seu enxague em água recém-bidestilada (um mínimo de 3 enxagues), antes de sua esterilização através de calor seco; a esterilização por vapor (autoclave) não deve ser empregada, pois irá determinar a recontaminação dessa vidraria lavada de modo especial.
- . Não observação dos cuidados requeridos no preparo das diluições. A precisão na realização das mesmas é fundamental, devendo ser observados todos os fatores que podem interferir (volume da água de diluição, volume da amostra transferida para o frasco contendo a água de diluição, homogeneização adequada da amostra a ser transferida, precisão na pipetagem).

A-2 Enterobacter aerogenes como organismo-teste

Enterobacter aerogenes é o organismo selecionado para esta prova devido à sua capacidade de crescimento em presença de concentrações mínimas de nutrientes, não requerendo aminoácido, complexos ou outros componentes que são necessários por exemplo, para E.coli ou Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e outras Pseudomonas, embora também capazes de crescer em meios mínimos, não seriam adequadas para esta prova, pois poderiam não ser sensíveis a substâncias tóxicas produzidas por Pseudomonas já presentes em uma amostra desconhecida de água destilada.

Anexo B

REVOGGADPT

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALB-1 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as precauções da Norma CETESB M1.001.

B-2 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa contendo os meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24 a 48 h. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-3 Armazenamento dos meios de cultura desidratados

Os frascos de meio de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens e mantidos em local fresco e seco, protegidos da luz.

B-4 Cuidados no preparo dos meios de cultura

B-4.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quanto à cor, odor, consistência e, principalmente, não se apresentarem endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes para que não liberem elementos tóxicos tais como: cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

B-4.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água bidestilada fria, principalmente para os meios que contêm agar, pois se for utilizada água quente, forma-se imediatamente em torno de cada partícula de agar uma película que protege o núcleo. Com a elevação da temperatura, ocorre um aquecimento seco do núcleo, que impede que a partícula se umedeça totalmente. Por esse motivo, aconselha-se deixar os meios que contenham agar de molho durante 15 minutos em água bidestilada fria, agitando-se a mistura frequentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

B-5 Recomendações para o preparo das soluções

Devido à sensibilidade da prova proposta na presente norma, recomenda-se a utilização de água recém-bidestilada para o preparo de todas as soluções.

B-6 Controle de qualidade dos meios de cultura

B-6.1 Todos os reagentes usados na preparação dos meios de cultura devem ser de grau bacteriológico. Isto é particularmente importante, pois certas impurezas químicas encontradas em reagentes de grau inferior ou comercial podem estar presentes em concentrações suficientes para suprimir ou inibir o crescimento bacteriano, ou possibilitar a ocorrência de reações inespecíficas.

B-6.2 Antes e após a esterilização, deve-se verificar o pH de cada partida de meio de cultura preparado, anotando-se seu valor, a data e o número de controle do lote. Esta verificação é fundamental, pois há possibilidade de ocorrência de erros nas pesagens, aquecimento excessivo, contaminação química ou deterioração de ingredientes durante o armazenamento e após a abertura dos frascos.

B-6.3 Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções e meios de cultura devem ser rotineiramente testados quanto à presença de bactérias e fungos contaminantes ou quanto a qualquer alteração porventura ocorrida com os corantes indicadores. Os meios de cultura devem ser ainda testados quanto à eficiência no isolamento de bactérias em teste e na especificidade em relação às reações bioquímicas.

B-6.4 Ensaio de controle para o teste de contagem de bactérias em placas

Para este teste, usam-se, para cada lote de agar triptona glicose extrato de levedura fundido, placas-controle, às quais se adiciona apenas esse meio. Após a solidificação do agar, as placas são incubadas em posição invertida a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas. Caso algum lote do meio esteja contaminado, os exames efetuados correspondentes deverão ser descartados. Deve ser feito também o teste para a água de diluição usada; para isto, inocular na placa 1 ml da água de diluição, adicionando-se a seguir, 12 a 15 ml de agar triptona glicose extrato de levedura fundido. Após solidificação do agar, incubar $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas. Podem ser realizados controles adicionais para determinar a contaminação de placas, pipetas e do ambiente de trabalho.

B-7 Precauções

B-7.1 Ao fundir o agar triptona glicose extrato de levedura, evitar:

- a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o agar, pois esta, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;
- b) exposição prolongada a temperaturas elevadas durante e após a fusão;

- c) fundir quantidade do meio superior à que será usado, num período de 3 horas, para evitar formação de partículas de fosfato insolúvel, que poderão ser confundidas com colônias de bactérias, durante a contagem de placas.

B-7.2 Durante a estabilização do agar triptona glicose extrato de levedura, evitar que a temperatura do banho-maria exceda 46°C, pois algumas bactérias mais sensíveis poderão ser mortas, quando se adiciona o meio sobre o inóculo.

B-8 Local de trabalho

A semeadura em placas deve ser efetuada, de preferência, em câmara asséptica ou capelas de fluxo laminar.

C-8.1 Câmara asséptica

As câmaras assépticas devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e ser livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. Conversa desnecessária deve ser evitada.

B-8.1.1 Limpeza da câmara: é feita após o expediente diário, sem varreções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim de semana, realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol puro, que é colocado em placas de Petri, para evaporar.

B-8.1.2 Lâmpadas germicidas (U.V.): podem ser ligadas nos intervalos de trabalho e assim permanecer durante a noite. Convém lembrar que estas lâmpadas tem tempo de vida relativamente curto (cerca de 6000 horas para lâmpadas de 30 Watts), que sua eficiência depende da distância existente entre elas e a área a ser esterilizada, que apresentam ação superficial apenas, e que poeira acumulada em sua superfície diminui seu poder germicida. Deve-se tomar medidas de proteção apropriadas para que não aconteça a exposição do operador às radiações ultra-violeta.

B-8.1.3 Calor: o aquecimento excessivo da câmara asséptica deve ser controlado pelo ajuste da altura da chama do bico de Bunsen através de seu dispositivo regulador ou pelo uso de uma pinça de Mohr. Se a câmara tiver ar condicionado, que a entrada desse ar não se dê diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha filtro de ar especial.

B-8.2 Capela de fluxo laminar

Proporciona grande segurança, pois as partículas existentes no ar são removidas pela passagem do mesmo através de um filtro absoluto. O ar filtrado, puro, é dirigido sob a forma de um fluxo direto sobre a área de trabalho, mantendo as condições de esterilização. A limpeza da capela deve ser feita sempre no final do trabalho.

Anexo C

REVOGADA

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985. p. 827-1038.
- C-2 BANGHAM, A.D. & HILL, M.W. Distillation and storage of water. Nature, 237-408, 1972.
- C-3 BORDNER, R. & WINTER, J. (ed) Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, 1978. 308 p. (EPA-600/8-78-017).
- C-4 BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (ed) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Willians & Wilkins Co., 1974, 1268 p.
- C-5 BURNETT, G.W. et alii. Preparation of media. In: Manual of Microbiological methods. New York, MacGraw-Hill Book, 1957.
- C-6 CETESB. São Paulo. Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de água. São Paulo, 1978. 81 p.
- C-7 _____. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978 (NT.L5.010).
- C-8 _____. Contagem padrão de colônias de bactérias. São Paulo, 1978. (NT.L5.201).
- C-9 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (NT.L5.216).
- C-10 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1978. (NT.M1.001).
- C-11 DIFCO LABORATORIES, Detroit. Difco manual - dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 ed. Detroit, 1984, 1155 p.
- C-12 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Handbook for analytical quality control in water and wastewater laboratories. Cincinnati, Ohio, 1979. (EPA-600/4-79-019).

C-13 GELDREICH, E.E. & CLARK, H.F. Distilled water suitability for microbiological applications. Journal of Milk and Food Technology, 28 (11): 351-355, 1965.

C-14 GELDREICH, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2 ed. U.S. Environmental Protection Agency, 1975. 195 p. (EPA-670/9-75-006).

C-15 KARAMIAN, N.A. Polytetrafluoroethylene tubing for transporting high purity water. American Laboratories, 5: 11-14, 1973.

C-16 WAKSMAN, S.A. Antagonistic relations of microorganisms. Bacteriological Reviews, 5: 231-291, 1953.

RENOGADA