



NORMA TÉCNICA

L5.231

Nov/1990
33 PÁGINAS

Coliformes e outros indicadores bacteriológicos - detecção em amostras de água através do teste de presença-ausência: método de ensaio

RENOVADA

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	COLIFORMES E OUTROS INDICADORES BACTERIOLÓGICOS – DETECÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA ATRAVÉS DO TESTE DE PRESENÇA-AUSÊNCIA	L5.231
	Método de ensaio	NOV/90

SUMARIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Documento complementar.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	4
5 Reagentes.....	8
6 Execução do ensaio.....	17
7 Resultados.....	27
Anexo A - Recomendações de ordem geral.....	29
Anexo B - Referências bibliográficas.....	31

INTRODUÇÃO

Desde o início da bacteriologia sanitária - marcada pela observação de Escherich, em 1885, de que o Bacillus coli (Escherichia coli) poderia ser usado como indicador de contaminação fecal da água - as bactérias do grupo coliforme têm sido extensivamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas, sendo até hoje o parâmetro microbiológico básico incluído nas legislações relativas a águas para consumo humano.

Em relação aos métodos convencionais recomendados para a quantificação dos coliformes nesse tipo de água, incluem-se a técnica de tubos múltiplos e a de membrana filtrante. No entanto, a ampla utilização dos mesmos tem demonstrado a ocorrência de fatores interferentes em ambos os métodos.

O reconhecimento das possíveis limitações desses métodos convencionais tem determinado a constante pesquisa de novas metodologias e, nesse sentido, foram publicados, já em 1968, os resultados de um estudo efetuado no Canadá, relativo à implantação de um teste qualitativo simplificado para a detecção de coliformes (teste de presença-ausência). Os resultados dessa pesquisa e de vários outros estudos comparativos desta metodologia com as técnicas de membrana filtrante e de tubos múltiplos têm demonstrado a boa sensibilidade do teste P-A, tendo o mesmo sido incluído, em 1989, na legislação americana como método alternativo para detecção de coliformes em água de consumo humano.

Em nosso país, essa inclusão ocorreu na legislação federal publicada em 1990, relativa ao monitoramento da qualidade de água de abastecimento público.

Aliados à boa sensibilidade, a facilidade de execução e o menor custo são fatores de importância a serem considerados na aplicação deste teste, principalmente em pequenas comunidades, em que são escassos os recursos econômicos.

Além destas vantagens, relativas especificamente à detecção de coliformes, o teste de Presença-Ausência possibilita que, a partir da inoculação inicial da amostra em um único meio de cultura, seja pesquisada a presença de outras bactérias de interesse sanitário, através da aplicação de testes confirmativos para as mesmas.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para a detecção de coliformes (totais e fecais) em amostras de água, através do teste de Presença-Ausência (P-A), assim como a determinação qualitativa dos seguintes indicadores de interesse sanitário: estreptococos fecais, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfringens e Aeromonas sp.

2 DOCUMENTO COMPLEMENTAR

Na aplicação desta Norma, é necessário consultar:

- Guia de Orientação para Coleta e Preservação de Amostras de Água CETESB, São Paulo, 1988.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.14.

3.1 Coliformes totais

Grupo de bactérias constituído por 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 (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35°C em 24-48 horas. O grupo inclui os seguintes gêneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella.

3.2 Coliformes fecais ou coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5 ± 0,2°C em 24 horas. O principal componente deste grupo é Escherichia coli, sendo que alguns coliformes do gênero Klebsiella apresentam também essa capacidade.

3.3 Aeromonas sp

Gênero de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positivas. A capacidade de fermentação da lactose com produção de gás, apresentada por algumas culturas de A. hydrophila, impõe a necessidade de realização de testes de diferenciação entre este gênero e os coliformes, para eliminar resultados falsos-positivos devidos a Aeromonas na detecção destes últimos.

3.4 Pseudomonas aeruginosa

Bacilos Gram-negativos, aeróbios facultativos. Produzem pigmentos fluorescentes e piocinina; entretanto, podem-se encontrar culturas apiocianogênicas. Crescem a 37° e a 42°C. Apresentam metabolismo oxidativo da glicose e resultado positivo no teste para oxidase. Sua pesquisa é de importância principalmente em águas recreacionais, em decorrência da associação entre sua presença e a ocorrência de infecções auditivas nos usuários dessas águas.

3.5 Staphylococcus aureus

Cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos. São catalase e coagulase positivas. Embora não sejam encontrados em grande número na flora normal da água, sua pesquisa é recomendada em águas recreacionais (piscinas e outras) e tanques de hidroterapia, devido ao seu caráter de patógeno oportunista, sendo implicado em processos supurativos, que variam desde espinhas, furúnculos, abscessos, até septicemias fatais. Sua elevada resistência aos processos de tratamento dessas águas reforça a importância de sua pesquisa nas mesmas.

3.6 Clostridium perfringens

Bacilos Gram-positivos, anaeróbios, imóveis, esporogênicos, apresentando esporos ovais (centrais ou subterminais). Causam a chamada "fermentação turbulenta" do leite: o caseinogênio é coagulado e os coágulos são rompidos, em decorrência da grande quantidade de gás produzido na fermentação da lactose. Sua pesquisa na água é de importância como indicador de contaminação fecal, com aplicações específicas devido à sua capacidade de formar esporos.

3.7 Streptococos fecais

Cocos Gram-positivos, ocorrendo geralmente aos pares ou em cadeias curtas. Apresentam resultados negativos na prova de catalase. Crescem na presença de sais biliares e à temperatura de 45°C. Ocorrem nas fezes humanas e de outros animais, sendo utilizados como indicadores de contaminação fecal.

3.8 Esporos

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

3.9 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.10 Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta.

3.11 Coco

Designação dada às bactérias que apresentam forma esférica.

3.12 Catalase

Enzima que cataliza a reação em que atuam duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma como doadora e outra como receptora de hidrogênio. Sua presença na bactéria, ao ser adicionado o peróxido de hidrogênio sobre uma suspensão da cultura, é evidenciada pela liberação de oxigênio (O_2), havendo formação de bolhas de gás.

3.13 Coagulase

Enzima que, reagindo com um cofator existente na plasma de certas espécies (coelho, cavalo, homem), transforma o fibrinogênio em fibrina. A pesquisa da coagulase é o critério mais amplamente utilizado para a diferenciação entre as espécies do gênero Staphylococcus, sendo a positividade neste teste fundamental para a caracterização de Staphylococcus aureus.

3.14 Oxidase

Enzima oxidativa da cadeia respiratória de bactérias, requerida para a oxidação do citocromo-c. No teste de pesquisa da oxidase, o citocromo-c, em sua forma oxidada, cataliza a oxidação do tetra-metil-p-fenilenodiamina, formando uma substância de coloração azul.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesadas 150 g¹.

4.1.2 Banhos-maria (41,5°C e 44,5°C)

Equipados com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter as temperaturas uniformes (41,5° e 44,5 ± 0,2°C) em todos os pontos. O nível de água no banho-maria deve ser mantido acima do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio, imersos para incubação, sendo recomendada a troca semanal dessa água para evitar a proliferação de fungos e outros microrganismos.²

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, cuja condutividade deve ser inferior a 2 µmhos/cm² a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²) produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.

2 Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalos de escala de 0,1°C. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.

4.1.4.2 Estufa de esterilização

Deve manter a temperatura de $(170 \pm 10^{\circ}\text{C})$ durante o período de esterilização (mínimo de 2 horas).

4.1.5 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C .³

4.1.6 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0, pH = 6,86 ou pH = 9,18).

4.1.7 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 10°C .

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

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

4.2.2 Frascos para o teste presuntivo

De vidro neutro, borossilicato ou plástico autoclavável, com tampas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis; devem ter volume suficiente para conter 50 mL do meio de cultura e 100 mL da amostra a ser analisada, deixando um espaço suficiente para permitir a homogeneização quando se fizer a agitação.

4.2.3 Frasco para coleta de amostra

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.4 Lâminas de vidro

4.2.5 Pipetas

³ A verificação da temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima na parte central da mesma. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

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

4.2.6 Placas de Petri de vidro

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.7 Provetas graduadas de 100 mL.

4.2.8 Tubos de Durham

De borossilicato ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro do tubo de ensaio em cujo interior serão utilizados.

4.2.9 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o meio de cultura e o inóculo da amostra.

Nota: Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm e de 12 mm x 120 mm.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7 a 8 cm de comprimento, com uma alça de 3 mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).³

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Estantes

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

4 Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. Após o uso, as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e descartadas. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante 3 horas.

4.3.5 Estojo para pipetas

Usar, para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel kraft para esterilização.

4.3.6 Pregos de ferro de 1 polegada.

4.3.7 Tela de amianto.

4.3.8 Termômetros.

4.3.9 Tripé.

5 REAGENTES

5.1 Meio de cultura.

Nota: Para o preparo dos meios de cultura devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório a partir de seus componentes específicos, devendo ser utilizadas, para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a).

5.1.1 Caldo P-A. (concentração tripla)5.1.1.1 Fórmula

Caldo lactosado (meio desidratado)	39,0 g
Caldo lauril triptose (meio desidratado)	52,5 g
Púrpura de bromocresol.....	0,0255 g
Água destilada	1 000 mL
pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C	

5.1.1.2 Preparo

Pesar e dissolver os meios desidratados caldo lactosado e caldo lauril triptose seqüencialmente em água destilada, sem aquecimento e sob agitação. Dissolver a púrpura de bromocresol em 10 mL de uma solução 0,1N de hidróxido de sódio e adicionar ao meio acima. Distribuir, em frascos de diluição com capacidade de 250 mL, contendo em seu interior tubos de ensaio de 12 x 120 mm em posição invertida, volumes adequados para a obtenção de 50 mL após autoclavação. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

5.1.2 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%

5.1.2.1 Fórmula

Peptona	10,0 g
Lactose	10,0 g
Bile de boi desidratada	20,0 g
Verde brilhante	0,0133 g
Água destilada	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C	

5.1.2.2 Preparo

Pesar 40,0 g de meio desidratado caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

5.1.3 Meio E.C.5.1.3.1 Fórmula

Triptose ou trypticase	20,0 g
Lactose	5,0 g
Mistura de sais biliares ou sais bilares nº3.....	1,5 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a	4,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a	1,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Água destilada	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C	

5.1.3.2 Preparo

Pesar 37,0 g do meio E.C desidratado e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 5 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

5.1.4 "M-Endo Agar LES"

5.1.4.1 Fórmula

Extrato de levedura	1,2 g
Casitona ou tripticase	3,7 g
Tiopeptona ou tiotona	3,7 g
Triptose	7,5 g
Lactose.....	9,4 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	3,3 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	3,7 g
Desoxicolato de sódio	0,1 g
Lauril sulfato de sódio	0,05 g
Sulfito de sódio (Na_2SO_3) p.a	1,6 g
Fucsina básica	0,8 g
Ágar	15,0 g
Água destilada (contendo 20 mL de álcool etílico p.a.....)	1 000 mL
pH final: $7,2 \pm 0,1$ a $25^\circ C$	

5.1.4.2 Preparo

Pesar 51,0 g do meio desidratado "M-Endo Agar LES" e acrescentar 1 000 mL de água destilada, contendo 20 mL de álcool etílico p.a., a 95%, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente, até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esfriar o meio a $45-50^\circ C$ e, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm. O meio pode ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura de 2 a $10^\circ C$, durante, no máximo, 2 semanas. Após esse período, deverá ser descartado.

5.1.5 Caldo lactose púrpura5.1.5.1 Fórmula

Triptona ou tripticase	5,0 g
Peptonaproteose nº 3.....	10,00g
Extrato de carne	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Lactose	10,0 g
Púrpura de bromocresol	0,02g
Água destilada	1 000 mL
pH final: $7,0 \pm 0,2$ a $25^\circ C$	

5.1.5.2 Preparo

Pesar os ingredientes e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, até a completa dissolução dos componentes. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertidos. Tamponar e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. O meio pode ser estocado durante, no máximo, duas semanas.

5.1.6 Ágar nutriente gelatina5.1.6.1 Fórmula

Ágar nutriente (meio desidratado)	23,0 g
Gelatina	30,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Água destilada	1 000 mL
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C.	

5.1.6.2 Preparo

Pesar o meio desidratado ágar nutriente e dissolver sob aquecimento em 500 mL de água destilada; adicionar, a seguir, o extrato de levedura. Dissolver a gelatina separadamente, nos 500 mL de água destilada restantes, e depois unir as duas soluções, formando 1 litro. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos e distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm.

5.1.7 Caldo azida etil violeta5.1.7.1 Fórmula

Triptose	20,0 g
Dextrose	5,0 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	2,7 g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄) p.a.....	2,7 g
Ácido clorídrico (HCl) p.a.....	5,0 g
Azida sódica (NaN ₃) p.a.....	0,4 g
Etil violeta	0,00083 g
Água destilada	1 000 mL
pH final após esterilização: 7,0 ± 0,2 a 25°C	

5.1.7.2 Preparo

Pesar 35,8 g do meio desidratado caldo azida etil violeta e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja

atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10 mL. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.1.8 Ágar enterococos

5.1.8.1 Fórmula

Triptose.....	20,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Dextrose.....	2,0 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	4,0 g
Azida sódica (NaN ₃) p.a.....	0,4 g
Ágar.....	10,0 g
Cloreto de 2, 3, 5 trifenil tetrazólio.....	0,1 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C	

5.1.8.2 Preparo

Pesar 41,5 g do meio desidratado Ágar-M-Enterococos e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Estabilizar a 45-50°C e distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm.

5.1.9 Ágar manitol

5.1.9.1 Fórmula

Extrato de carne bovina.....	1,0 g
Mistura de peptonas.....	10,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	75,0 g
D-manitol.....	10,0 g
Ágar.....	15,0 g
Vermelho de fenol.....	0,025 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C	

5.1.9.2 Preparo

Pesar 111 g do meio desidratado "Mannitol Salt Agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa

dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar a temperatura do meio a 45-50°C em banho-maria e distribuir volumes de 15 a 20 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm.

5.1.10 Caldo de soja e triptona

5.1.10.1 Fórmula

Peptona de caseína.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
D-glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	2,5 g
Água destilada	1 000 mL
pH do meio após esterilização: 7,3 ± 0,2 a 25°C	

5.1.10.2 Preparo

Pesar 30 g do meio desidratado Caldo de soja e triptona e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.1.11 Meio de Drake

5.1.11.1 Fórmula

Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) p.a.....	0,5 g
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄) p.a.....	10,0 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	1,0 g
L-asparagina p.a.....	2,0 g
Glicerina p.a.....	10,0 g
Água destilada.....	1.000 mL
pH final: 7,6 ± 0,2 a 25°C	

5.1.11.2 Preparo

Pesar os ingredientes e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 x 150 mm. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.1.12 Ágar leite desnatado

5.1.12.1 Fórmula

Leite em pó desnatado.....	100,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final: $6,4 \pm 0,2$ a 25°C

5.1.12.2 Preparo

Pesar o ágar e o leite em pó e dissolver esses ingredientes, separadamente, em água destilada, sob aquecimento. Autoclavar as duas soluções a 121°C durante 15 minutos. Após estabilização da temperatura das mesmas a $45-50^{\circ}\text{C}$, em banho-maria, juntar essas duas soluções e distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 150 mm.

5.1.13 Meio de leite desnatado

5.1.13.1 Fórmula

Leite desnatado.....	100,0 g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final: $6,4 \pm 0,2$ a 25°C

5.1.13.2 Preparo

Pesar o leite desnatado e adicioná-lo, vagorosamente, à água destilada sob agitação e sem aquecimento, para sua completa dissolução. Distribuir volumes de 20 mL em tubos de ensaio de 18 x 180 mm, contendo um prego em seu interior (ver nota abaixo). Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Remover rapidamente da autoclave, após a esterilização e, dentro de no máximo 10 minutos, colocar os tubos em refrigerador. O meio, mantido sob refrigeração, pode ser utilizado dentro de um prazo máximo de 2 semanas. Antes do uso, o meio deve ser fervido, para serem obtidas as condições de anaerobiose requeridas para o crescimento de Clostridium perfringens.

Nota: São utilizados pregos de 1 polegada, cujo preparo requer sua imersão prévia em xilol durante 24 horas. Após esse período, os mesmos são lavados várias vezes em água destilada e submetidos à secagem em estufa durante uma noite. É utilizado um prego em cada tubo de ensaio.

5.2 Soluções

5.2.1 Solução saturada de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.2.1.1 Fórmula

Sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a.....	70 g
Água recém-destilada.....	100 mL

5.2.1.2 Preparo

Pesar 70,0 g de sulfato de amônio e acrescentar 100 mL de água recém-destilada. Após a dissolução, armazenar em frasco de vidro bem vedado.

5.2.2 Reagentes para o teste de oxidase

5.2.2.1 Fórmula

Cloridrato de N, N, N, ' N, ' - tetrametil-p-fenileno-	
nodiamina.....	1,0 g
Água destilada.....	100 mL

5.2.2.2 Preparo

Pesar 1,0 g do cloridrato N, N, N, ' N, ' - tetrametil-p-fenilenodiamina, acrescentar 100 mL de água recém-destilada, homogeneizando bem até a completa dissolução do reagente. Guardar a solução em frasco âmbar, em geladeira (2 a 8°C), durante no máximo 2 dias.

Nota: A adição de ácido ascórbico a essa solução (na concentração de 0,1%) retarda a auto-oxidação do reagente.

5.2.3 Solução de peróxido de hidrogênio a 3%

5.2.3.1 Fórmula

Peróxido de hidrogênio	3 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

5.2.3.2 Preparo

Colocar 3 mL de peróxido de hidrogênio em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Misturar através de agitação. Armazenar a 4°C em frasco bem vedado.

5.2.4 Soluções para a coloração de Gram

5.2.4.1 Solução de cristal-violeta

5.2.4.1.1 Solução A

Fórmula:

Cristal-violeta.....	2 g
Álcool etílico a 95%.....	20 mL

Preparo:

Dissolver 2 g de cristal-violeta em 20 mL de álcool etílico a 95% e filtrar em papel grosso ou algodão.

5.2.4.1.2 Solução BFórmula:

Oxalato de amônia.....	0,8 g
Água destilada.....	80 mL

Preparo:

Dissolver 0,8 g de oxalato de amônia em 80 mL de água destilada.

5.2.4.1.3 Preparo da solução de cristal-violeta

Misturar as soluções A e B, 24 horas antes do uso, filtrando através de papel de filtro.

5.2.4.2 Solução de lugol5.2.4.2.1 Fórmula

Cristais de iodo.....	1,0 g
Iodeto de potássio (KI) p.a.....	2,0 g
Água destilada.....	300 mL

5.2.4.2.2 Preparo

Dissolver 2 g de iodeto de potássio em 5 mL de água destilada. Adicionar 1 g de cristais de iodo à solução de iodeto de potássio e agitar até que o iodo se dissolva. Adicionar água destilada, até completar o volume de 300 mL.

5.2.4.3 Solução de safranina5.2.4.3.1 Fórmula

Safranina.....	2,5 g
Álcool etílico a 95%	100 mL

5.2.4.3.2 Preparo

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico a 95%, preparando-se, assim, a solução estoque de safranina. No momento do uso adicionar 10 mL dessa solução estoque de safranina a 100 mL de água destilada.

5.2.4.4 Solução de álcool-acetona (1:1)Preparo:

Misturar álcool etílico a 95% e acetona em partes iguais.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Sumário do método

O método baseia-se na inoculação de volumes de 100 mL da amostra em frascos adequados, contendo 50 mL de meio presuntivo (Caldo P-A), em concentração tripla. A incubação é feita a 35°C, sendo realizadas leituras após cada 24 horas, durante um período máximo de 5 dias. Neste meio de cultura, é considerado resultado presuntivo positivo para as culturas que determinam a acidificação do mesmo (evidenciada pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo), com ou sem produção de gás. Essas culturas são submetidas a teste confirmativos para: coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, Aeromonas sp, Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988.

6.2.1 Amostra

6.2.1.1 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.2.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiossulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo essa quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

6.2.1.3 Agentes quelantes: para a coleta de amostras de águas poluí

das, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

6.2.1.4 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e início de exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

6.3 Procedimento

6.3.1 Exame presuntivo

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

6.3.1.2 Disponibilizar sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução da análise, a saber:

6.3.1.2.1 Frascos contendo 50 mL do Caldo P-A, identificados com o número da amostra e a data.

6.3.1.2.2 Provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra.

6.3.1.2.3 Bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico.

6.3.1.3 Homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45°C entre o braço e o antebraço.

6.3.1.4 Dosar 100 mL da mesma em uma proveta estéril e proceder à inoculação, vertendo cuidadosamente esse volume da amostra no frasco contendo o Caldo P-A, tomando cuidado para que não ocorra entrada de ar no tubo contido no interior do frasco.

6.3.1.5 Após a inoculação das amostras, efetuar sua incubação a 35°C, durante 24 horas.

6.3.1.6 Após esse período de incubação, efetuar a 1ª leitura, considerando como resultado positivo a acidificação do meio (evidenciada pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo), com ou sem produção de gás. Se os resultados forem negativos, retornar os frascos à incubadora, efetuando novas leituras a cada 24 horas, até completar um período de 5 dias.

6.3.1.7 Submeter as culturas com resultado presuntivo positivo aos testes confirmativos, para a determinação de: coliformes totais, coliformes fecais, Aeromonas sp., Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, estreptococos fecais e Clostridium perfringens (ver Figura - Esquema do procedimento do teste P-A).

6.3.2 Exames confirmativos

Nota: Para a realização dos exames confirmativos, todas as culturas com resultado positivo no caldo P-A, após 24 horas a 5 dias de incubação, são transferidas imediatamente após as respectivas leituras, para os seguintes meios de cultura:

- Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%;
- Meio EC;
- M.Endo Agar LES;
- Caldo etil violeta;
- Ágar manitol;
- Meio de Drake;
- Meio de leite desnatado;

Esses exames confirmativos são descritos nos itens 6.3.2.1 a 6.3.2.7, devendo ser observados os seguintes cuidados gerais em sua execução:

- a) antes da transferência de inóculos das culturas positivas em caldo P-A para os meios confirmativos, verificar se o crescimento bacteriano se apresenta uniformemente distribuído ao meio de cultura ou se se encontra sedimentado no fundo do frasco; neste último caso, é requerida uma leve agitação do frasco, para a redispersão das bactérias;
- b) imediatamente após a abertura do frasco contendo as culturas positivas em caldo P-A, flambar a boca do mesmo, antes de colher os inóculos; repetir essa operação antes de seu fechamento;

6.3.2.1 Exames confirmativos para coliformes e Aeromonas.

6.3.2.1.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flamba

da e resfriada, retirar um inóculo da cultura positiva em caldo P-A.

6.3.2.1.2 Transferir esse inóculo para um tubo contendo caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e outro para um tubo com meio EC⁵; e, através de estrias, transferir um terceiro inóculo para a superfície de M-Endo Ágar LES, contido em placa.

6.3.2.1.3 Após a inoculação, incubar esses meios às seguintes temperaturas:

- a) caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%: 24-48h, a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- b) meio EC: 24h a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$;
- c) M-Endo Ágar LES: 24h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (placa em posição invertida).

6.3.2.1.4 Após os períodos determinados de incubação, efetuar as leituras, considerando resultado positivo para coliformes totais a produção de gás a partir da fermentação da lactose no meio caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%; coliformes fecais estão presentes se houver produção de gás no meio EC.

6.3.2.1.5 Após as 24h de incubação do meio M-Endo Ágar LES, efetuar a leitura⁶, considerando típicas as colônias fermentadoras da lactose, que apresentam coloração vermelho-escura, com brilho verde-metálico superficial⁷.

6.3.2.1.6 Após anotação na ficha de laboratório dos tipos de colônias observados no M-Endo Ágar LES, selecionar colônias representativas, dando preferência às fermentadoras da lactose e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo de cada colônia selecionada para Caldo lactose púrpura e outro para uma placa contendo ágar nutriente gelatina.

6.3.2.1.7 Incubar o caldo lactose púrpura durante 24 horas e o ágar nutriente gelatina durante 24-48 horas, ambos a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

5 O meio EC deve ser mantido em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C}$ durante um mínimo de 30 minutos antes de sua utilização.

6 Essa leitura é efetuada com auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente colocada em direção a mis próxima possível da perpendicular em relação à superfície da placa com o meio M-Endo Ágar LES.

7 Se ocorrerem colônias típicas em M-Endo Ágar LES, paralelamente à obtenção de resultados negativos no caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%, é requerida a transferência de um novo inóculo da cultura positiva no caldo P-A para outra placa de M-Endo Ágar LES.

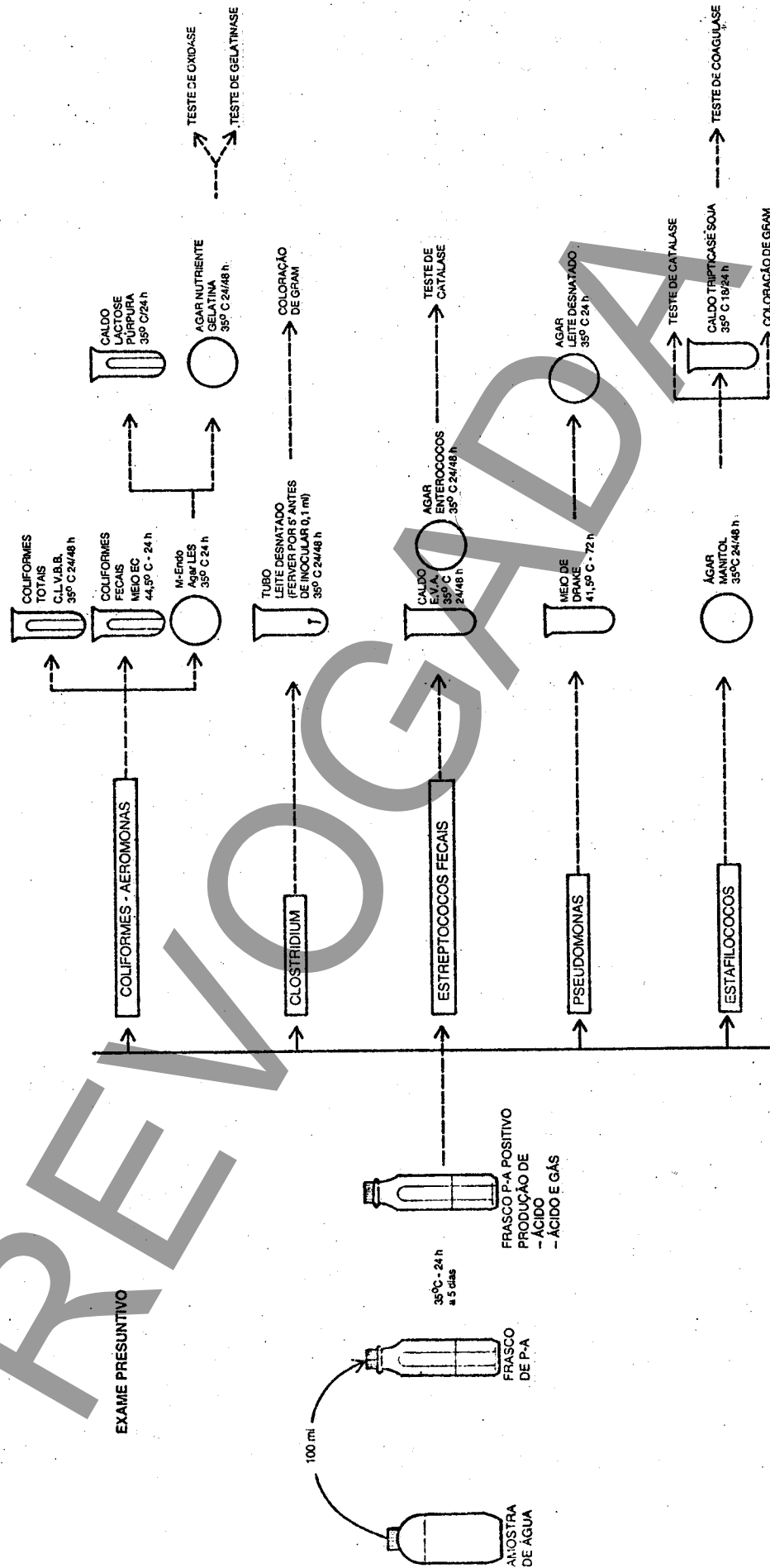


FIGURA -- Esquema do procedimento (teste P/A)

6.3.2.1.8 Efetuar a leitura do caldo lactose púrpura, considerando o crescimento com acidificação do meio (decorrente da fermentação da lactose), evidenciada pela coloração amarela, com ou sem produção de gás. Anotar os resultados.

6.3.2.1.9 A partir do crescimento obtido após 24 horas no ágar nutriente gelatina, efetuar o teste para pesquisa da oxidase, procedendo do seguinte modo:

- a) com uma alça de inoculação de platina, devidamente flameada e resfriada, transferir um pequeno inóculo de uma colônia bem isolada em ágar nutriente gelatina para a superfície de uma folha de papel de filtro, previamente colocada no fundo de uma placa de Petri e embebida com algumas gotas de uma solução aquosa a 1% de cloridrato de N-N'-N'-tetra metil-p-fenilenodiamina;
- b) efetuar a leitura, considerando como resultado positivo o desenvolvimento de uma coloração azul intensa em aproximadamente 30 segundos, no local em que foi depositada a cultura.

Nota: Se não ocorrer nenhuma reação até dois minutos após a colocação da cultura, considerar resultado negativo para este teste.

6.3.2.1.10 Após a retirada de um inóculo da cultura em ágar nutriente gelatina para a realização do teste de oxidase, retornar a placa, em posição invertida, à incubadora a 35°C, por um período adicional de 24 horas.

6.3.2.1.11 Após esse período, retirar a placa da incubadora e recobrir o crescimento em sua superfície com uma solução saturada de sulfato de amônio. A formação de uma zona mais transparente que o meio de cultura ao redor do crescimento bacteriano constitui resultado positivo no teste de gelatinase.

Nota: São os seguintes os resultados nestes testes para coliformes e Aeromonas

- a) coliformes totais
 1. Fermentação da lactose com produção de ácido e gás nos meios caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e caldo lactose púrpura;
 2. Crescimento de colônias fermentadoras da lactose em

M-Endo Ágar LES;

3. Resultado negativo no teste de oxidase.

b) coliformes fecais

1. Fermentação da lactose com produção de ácido e gás no meio EC a 44,5°C e no caldo lactose púrpura;
2. Crescimento de colônias fermentadoras da lactose em M-Endo Ágar LES;
3. Resultado negativo no teste de oxidase.

c) Aeromonas sp

1. Resultados positivos nos testes de oxidase e gelatinase;
2. Crescimento, usualmente sem produção de gás, no caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e no caldo lactose púrpura;
3. As colônias no M-Endo Ágar LES podem ser lactose-positivas ou lactose-negativas.

6.3.2.2 Exames confirmativos para estreptococos fecais.

6.3.2.2.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, colher dois a três inóculos da cultura positiva em caldo P-A, transferindo-os para um tubo contendo caldo azida etil-violeta.

6.3.2.2.2 Colher outro inóculo e transferi-lo, através de estrias, para a superfície do ágar enterococos, contido em placa de Petri previamente identificada.

6.3.2.2.3 Incubar os dois meios inoculados durante 24-48 horas à temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6.3.2.2.4 Após o período determinado de incubação, proceder à leitura, considerando resultado positivo para estreptococos fecais em caldo azida etil-violeta a ocorrência de um denso crescimento bacteriano.

Nota: Com algumas culturas, pode ocorrer a sedimentação da suspensão bacteriana, havendo a formação de um precipitado azul.

6.3.2.2.5 Após o período determinado de incubação do ágar enterococos, proceder à leitura, considerando como típicas de estreptococos fecais as colônias pequenas com coloração vermelho-escura ou castanho-avermelhada.

6.3.2.2.6 Selecionar 2 a 3 colônias típicas de estreptococos fecais no ágar enterococos e proceder à confirmação através do teste para pesquisa da catalase, transferindo, com uma alça de inocula

ção, uma pequena quantidade de cultura para uma lâmina de vidro e adicionando sobre a mesma algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. A ausência de bolhas constitui resultado negativo para catalase e a formação de bolhas, teste de catalase positivo.

6.3.2.2.7 Considerar teste confirmativo para estreptococos fecais quando ocorrer crescimento no caldo azida etil-violeta e as colônias típicas no ágar enterococos apresentarem resultado negativo no teste para pesquisa da catalase.

6.3.2.3 Exame confirmativo para determinação de Staphylococcus aureus.

6.3.2.3.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, colher um inóculo da cultura positiva em caldo P-A.

6.3.2.3.2 Transferir esse inóculo, através de estrias, para uma placa contendo ágar manitol, previamente identificada.

6.3.2.3.3 Incubar a placa em posição invertida, durante 24-48 horas à temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6.3.2.3.4 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura, considerando como típicas de Staphylococcus aureus as colônias que apresentarem de 2 a 3 mm de diâmetro e coloração amarela brilhante; geralmente a cor do meio ao redor dessas colônias muda de rosa para amarela.

Nota: Outras bactérias podem crescer nesse meio, formando colônias atípicas, brancas ou rosas. Ocasionalmente, certos organismos bacilares podem ocorrer, formando colônias amarelas mucóides.

6.3.2.3.5 Todas as colônias em ágar manitol suspeitas de serem Staphylococcus aureus devem ser submetidas à confirmação através da realização dos testes de catalase e coagulase e da coloração de Gram, conforme descrito a seguir:

a) teste para pesquisa da catalase:

- com uma alça de inoculação, devidamente flambada e resfriada, transferir, para uma lâmina de vidro, um pequeno inóculo de cada colônia a ser confirmada;
- adicionar sobre o mesmo algumas gotas de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3%;
- se ocorrer uma reação efervescente (formação de bolhas), o resultado é positivo para este teste;
- dar prosseguimento aos testes de confirmação (coloração de Gram e pesquisa da coagulase) apenas para as

colônias catalase-positivas.

b) coloração de Gram

b.1) preparo do esfregaço

- limpar bem as lâminas de vidro necessárias para livrá-las de qualquer traço de película oleosa;
- colocar uma gota de água destilada sobre cada lâmina;
- com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, colher um pequeno inóculo de cada uma das colônias que apresentaram resultado positivo no teste de catalase, suspendendo-as, individualmente, na gota de água destilada colocada sobre a lâmina correspondente;
- com a ponta da alça de inoculação, espalhá-la sobre a lâmina, de modo a formar uma película bem fina;
- fixar o esfregaço, passando a lâmina 3 vezes sobre uma chama.

b.2) coloração

- cobrir o esfregaço durante um minuto com solução de cristal-violeta;
- remover o excesso dessa solução da lâmina, lavando-a levemente com água corrente;
- cobrir o esfregaço com solução de lugol durante um minuto;
- descorar o esfregaço, usando uma solução álcool-acetona (1:1);
- cobrir o esfregaço, durante 15 segundos, com solução de safranina;
- lavar a lâmina em água corrente e enxugá-la delicadamente com papel de filtro, através de leve compressão do mesmo sobre a lâmina.

b.3) exame microscópico

- examinar as lâminas ao microscópio, usando objetiva de imersão. Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos (corados em roxo).

c) teste para pesquisa da coagulase

Notas: 1. Este teste é efetuado apenas para as colônias em ágar manitol que apresentaram resultado positivo no teste de catalase e demonstraram ser cocos Gram-positivos.

2. Para a realização deste teste, usar, como controles, uma cultura coagulase-positiva (Staphylococcus aureus) e outra coagulase-negativa (Escherichia coli).

- com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, colher um inóculo de cada colônia em Ágar Manitol a ser confirmada;
- transferir cada inóculo para um tubo contendo caldo de soja e triptona e incubar a 35°C durante 18-24 horas;
- após esse período de incubação, retirar 0,05 mL dessa cultura e transferi-lo para um tubo de ensaio estéril de 12 x 120 mm, contendo 0,5 mL de plasma de coelho. Efetuar a homogeneização, através de rotação do tubo;
- incubar a 35°C durante 4 horas;
- após esse período, efetuar a leitura, considerando como resultado positivo a coagulação do plasma.
Staphylococcus aureus são coagulase positivos.

6.3.2.4 Exame confirmativo para determinação de Pseudomonas aeruginosa.

6.3.2.4.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, retirar um inóculo da cultura positiva em Caldo P-A.

6.3.2.4.2 Transferir o inóculo para um tubo, previamente identificado, contendo o meio de Drake.

6.3.2.4.3 Incubar durante 72 horas em banho-maria a 41,5°C.

6.3.2.4.4 Efetuar leituras a cada 24 horas, com auxílio de luz ultravioleta (366 nm) para verificação de fluorescência.

6.3.2.4.5 A partir do aparecimento de fluorescência, repicar a cultura para ágar leite desnatado.

6.3.2.4.6 Incubar a placa em posição invertida durante 24 horas a 35 ± 0,5°C.

6.3.2.4.7 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura, considerando resultado positivo para P.aeruginosa nesse meio a produção de um pigmento verde, que se difunde para o meio de cultura, e a hidrólise de caseína, evidenciada pela ocorrência de um halo ao redor das colônias.

6.3.2.5 Exame confirmativo para Clostridium perfringens.

6.3.2.5.1 Com auxílio de uma pipeta, coletar um inóculo de 0,1 mL da cultura positiva em Caldo P-A, tomando cuidado para que esse inóculo seja coletado do fundo do frasco.

6.3.2.5.2 Transferir esse inóculo para um tubo contendo o meio leite desnatado (previamente fervido durante 5 minutos e resfriado rapidamente a 45°C), efetuando essa inoculação em profundidade.

6.3.2.5.3 Incubar durante 24-48 horas, à temperatura de 35°C.

6.3.2.5.4 Efetuar a leitura a cada 24 horas, para verificar a ocorrência de "fermentação turbulenta do leite". Nesse meio, C.perfringens coagula o leite e a grande quantidade de gás produzida determina o aparecimento de orifícios nos coágulos formados.

6.3.2.5.5 Se isto ocorrer, preparar um esfregaço dessa cultura e efetuar a coloração de Gram, segundo descrito no item 6.3.2.3.5.b. Se o exame microscópico evidenciar a presença de pequenos bacilos roliços, Gram-positivos (corados em roxo), com as pontas quadradas, ocorrendo isolados ou em cadeias curtas, essas células são típicas de C.perfringens.

7 RESULTADOS

O resultado, para cada indicador pesquisado, é expresso como:

Presença(ou ausência)/100 mL

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO A - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALA-1 Controle de qualidade analítica

Programas sistemáticos de controle de qualidade analítica constituem uma atividade de fundamental importância em laboratórios de análises bacteriológicas da água, dada a importância dos dados gerados e sua implicação em termos de saúde pública.

Considerando a diversidade de atividades desenvolvidas no laboratório, o controle de qualidade atua como suporte, visando eliminar ou reduzir erros que possam ocorrer em qualquer atividade laboratorial, seja devido a pessoal, equipamentos, materiais ou reagentes, garantindo, dessa forma, a qualidade do trabalho desenvolvido, desde a coleta da amostra até a emissão dos resultados.

Os seguintes itens devem ser considerados para o controle de qualidade analítica em laboratórios de análises microbiológicas de águas:

- controle de qualidade de equipamentos;
- lavagem, preparo e esterilização de materiais;
- controle de qualidade de meios de cultura, através de testes como o de hidrólise da lactose, sensibilidade, especificidade e esterilização;
- controle de qualidade da água destilada;
- controle de qualidade de materiais;
- avaliação da precisão dos técnicos na execução de análises; e
- avaliação da qualidade do detergente.

Todas as informações necessárias relativas, aos procedimentos citados estão descritas nas seguintes Normas Técnicas:

- Norma Técnica CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água.
- Norma Técnica CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.
- Norma Técnica CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.
- Norma Técnica CETESB L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergente para lavagem.
- Norma Técnica CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

REVOGADA

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Microbiological examination of water. In: - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, APCF, p. 827-1038, 1985.
- B-2 BISSONETTE, G.K.; JEZESKI, J.J. McFETERS, G.A. & STUART, D.G. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Appl. Microbiol. 29: 186-194, 1975.
- B-3 BRASIL, Leis Decretos...Portaria nº 36. Dispõe sobre as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observadas em todo território nacional. Brasília, Diário Oficial da União, 19 de janeiro de 1990.
- B-4 BURMAN, N.P. Developments in membrane filtration techniques. II. Adaptation to routine and special requirements. Proc. Soc. Water Treatment and Examination, 16: 40-50, 1967.
- B-5 CETESB. Coliformes totais - Determinação pela técnica de membrana filtrante. São Paulo, 1984, 1ª Revisão (Norma Técnica L5.214).
- B-6 _____. Coliformes totais e fecais - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo, 1984, 1ª Revisão (Norma Técnica L5.202).
- B-7 _____. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água CETESB, São Paulo, 1988, 150 p.
- B-8 _____. Staphylococcus aureus - Determinação pela técnica de membrana filtrante. São Paulo, 1986 (Norma Técnica L5.206).
- B-9 COLLINS H.C. LYNE M.P. & Grange M.J. Microbiological Methods 6ª ed., London, 1989.
- B-10 CLARK, J.A. A Presence-absence (P-A) test providing sensitive and inexpensive detection of coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci in municipal drinking water supplies. Canadian Jour. Microbiol., 14: 13-18, 1968.

- B-11 CLARK, J.A. The detection of various bacteria indicative of water pollution by a presence-absence (P-A) procedure Can. Jour. Microbiol., 15: 771-780, 1969.
- B-12 CLARK, J.A. Presence-absence (P-A) procedure for detection of indicator bacteria in drinking water supplies. Apostila mimeografada, 1983, 37 p.
- B-13 CLARK, J.A. The influence of increasing number of nonindicator organisms upon the detection of indicator organisms by the membrane filter and presence-absence tests. Can. Jour. Microbiol., 26: 827-832, 1980.
- B-14 CLARK, J.A.; BURGER, C.A. & SABATINOS, L.E. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water, and new main water samples. Can Jour. Microbiol., 28: 1102-1012, 1982.
- B-15 EVANS, T.M.; SEIDLER, R.J. & Le CHEVALLIER, M.W. Impact of verification media and resuscitation on accuracy of the membrane filter total coliform enumeration technique. Appl. Environ. Microbiol., 41: 1114-1151, 1981.
- B-16 FEDERAL REGISTER. Drinking Water: National Primary Drinking Water Regulations: Total Coliforms (Including Fecal Coliforms and E.coli) - Final Rule. United States, Environmental Protection Agency, 40: 41-142, June 29, 1989.
- B-17 JACOBS, J.N.; ZEIGLER, L.W.; REED, C.F.; STUKEL, A.T. & RICE, W.E. Comparison of membrane filter, multiple-fermentation-tube, and presence-absence techniques for detecting total coliforms in small community water systems. Appl. Environ. Microbiol., 51: 1007-1012, 1986.
- B-18 McFETERS, G.A.; CAMERON, S.C. & LeCHEVALLIER, M.W. Influence of diluents, media and membrane filters on the detection of injured waterborne coliform bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 43: 97-103, 1982.

- B-19 MORGAN, G.B.; GUBBINS, P.& MORGAN, V.A critical appraisal of the membrane filter technic. Health Lab.Sci., 2: 227-237, 1965.
- B-20 PELLIZARI, V.H. Comparação entre o teste de presença-ausência (P/A) e o teste de membrana filtrante para caracterização bacteriológica de águas tratadas. Monografia - Organização Santamarense de Educação e Cultura, São Paulo, 1986, 70p.
- B-21 PIPES, W.O. & CHRISTIAN, R.D. Estimating mean coliform densities of water distribution systems. J. Amer. Water Works Assoc., 76: 60-64, 1984.
- B-22 SHIPE, E.L. & CAMERON, G.M. A comparison of the membrane filter with the most probable number method for coliform determinations from several waters. Appl. Microbiol., 2: 85-88, 1984.