



NORMA TÉCNICA

L5.530

Mai/1992
31 PÁGINAS

Coliformes fecais: determinação em 7 horas pela técnica de membrana filtrante - método de ensaio

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

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

CETESB	COLIFORMES FECAIS – DETERMINAÇÃO EM 7 HORAS PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE Método de ensaio	L5.530 MAI/92
--------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Documentos complementares.....	2
3 Definições.....	4
4 Aparelhagem.....	4
5 Meios de cultura e soluções.....	9
6 Execução do ensaio.....	11
7 Resultados.....	18
Anexo A - Informações complementares.....	21
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	25
Anexo C - Referências bibliográficas.....	31

INTRODUÇÃO

Para avaliação da qualidade sanitária da água, do ponto de vista microbiológico, visando a prevenção de doenças de veiculação hídrica, são utilizadas as bactérias do grupo coliforme, particularmente o sub-grupo dos coliformes fecais, que permitem estimar o grau de contaminação fecal na água.

Os métodos convencionais empregados para a quantificação dessas bactérias em água incluem a técnica de tubos múltiplos, que requer um tempo relativamente longo para a obtenção de resultados (até 96 horas para coliformes totais e até 72 horas para coliformes fecais) ou a técnica de membrana filtrante, através da qual os resultados podem ser obtidos em 24 horas.

Considerando que o tempo para obtenção de resultados é um fator de fundamental importância em análise de águas, em situações de emergência, tais como falhas no sistema de tratamento de água, rompimento na rede de distribuição, ligações cruzadas, interrupções no sistema de abastecimento de água à comunidade, causadas por desastres, que determinam o risco de contaminação fecal, uma rápida avaliação da qualidade sanitária da água se faz necessária e, para essa finalidade, pode ser empregada a técnica de membrana filtrante, utilizando-se o meio "Ágar M-7 Horas" que agiliza a obtenção de resultados necessários para a tomada das medidas requeridas.

Esse método simplificado permite a recuperação dos coliformes fecais presentes na água em um tempo menor (7 horas) graças à associação de dois fatores: a presença de dois substratos fermentáveis por estes organismos (lactose e manitol) no meio de cultura empregado, possibilitando a opção entre duas vias metabólicas, o que facilita sua recuperação e permite o seu crescimento mais rápido, a uma temperatura de incubação de 41,5°C.

Apesar deste método se constituir em uma alternativa válida para uso em situações específicas, sua especificidade na detecção de coliformes fecais é inferior à dos meios de cultura convencionalmente empregados para quantificação dessas bactérias. Isto é esperado, visto que a temperatura de incubação empregada para esse meio (41,5°C), em relação à temperatura mais elevada para os outros meios (44,5°C), possibilita o crescimento de outros coliformes que não são especificamente de origem fecal, conforme pode ser constatado na Tabela 1, que sumariza os resultados obtidos em um estudo efetuado na CETESB, relativo ao teste de diferentes meios de cultura para quantificação de coliformes fecais através da técnica de membrana filtrante.

Estes dados não invalidam, no entanto, sua utilização em situações em que é requerida uma avaliação rápida do grau de contaminação fecal na água. Além disso, pode ser particularmente útil para a detecção rápida de alterações na qualidade de águas recreacionais e também no monitoramento da eficiência dos processos de tratamento de esgotos.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve a técnica de membrana filtrante para a determinação da densidade de bactérias do grupo coliformes fecais, com aplicação restrita a situações de emergência, em que é necessária uma rápida avaliação do grau de contaminação fecal em águas destinadas a abastecimento público ou águas recreacionais. É aplicável, também, no monitoramento da eficiência dos processos de tratamento de esgotos.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

TABELA 1 - Porcentagem de isolamento de gêneros e espécies do grupo coliforme
Técnica de Membrana Filtrante (MF)

Bact. Ident. Procedência	Ágar Tergitol 7				Ágar MFC-Ágar Lactose				Caldo MFC				Ágar M-7 Horas				Caldo Teepol Enriquecido			
	<u>E.coli</u> *	<u>Kleb.</u> *	<u>Ent.</u> **	<u>Cit.</u> ***	<u>E.coli</u> *	<u>Kleb.</u> *	<u>Ent.</u> **	<u>Cit.</u> ***	<u>E.coli</u> *	<u>Kleb.</u> *	<u>Ent.</u> **	<u>Cit.</u> ***	<u>E.coli</u> *	<u>Kleb.</u> *	<u>Ent.</u> **	<u>Cit.</u> ***	<u>E.coli</u> *	<u>Kleb.</u> *	<u>Ent.</u> **	<u>Cit.</u> ***
Poco n = 20	97,53	2,47	-	-	98	2	-	-	99	1%	-	-	77,60	17,60	1,60	3,2	86,21	13,79	-	-
Represa n = 20	95,0	5,0	-	-	94,95	5,05	-	-	94,95	5,05%	-	-	74,58	25,42	-	-	83,78	16,22	-	-
Esgoto n = 20	100	-	-	-	98,96	1,04	-	-	98,96	1,04	-	-	86,66	12,00	0,67	0,67	94,74	5,26	-	-
Porcentagem Média	97,51	2,49	-	-	97,30	2,71	-	-	97,63	2,36%	-	-	79,61	18,34	1,05	1,29	88,24	11,75	-	-

n = número de amostras analisadas

* Klebsiella

** Enterobacter

*** Citrobacter

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia.
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB, 1988.

3 DEFINIÇÕES

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

3.1 Grupo coliforme

Inclui todos os bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose com produção de gás em 24-48 h a 35°C. Neste grupo são incluídos 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 $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas. O principal componente deste grupo é Escherichia coli, sendo que alguns coliformes do gênero Klebsiella apresentam também essa capacidade. Em relação à metodologia descrita nesta Norma, é empregada a temperatura de 41,5°C, o que permite a recuperação de outros coliformes que não são de origem exclusivamente fecal.

3.3 Ágar M-7 horas

Meio seletivo para a determinação de coliformes fecais pela técnica de membrana filtrante, no qual a acidificação decorrente da fermentação da lactose e do manitol é evidenciada pela coloração das colônias, que vai do amarelo claro ao amarelo brilhante, devido à viragem dos indicadores de pH (vermelho de fenol e púrpura de bromocresol).

3.4 Esporos

Estruturas especializadas que se formam em certas bactérias Gram-positivas sob condições 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.

3.5 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

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

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme ($41,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para imergir os sacos plásticos (contendo as placas de Petri com o meio de cultura e a membrana), sendo recomendada a troca semanal da água, para evitar a proliferação de fungos e/ou outros microrganismos.²

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, cuja condutividade deve ser inferior a $2 \mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1000 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 ($1,05 \text{ kgf}/\text{cm}^2$ ou $15 \text{ lb}/\text{pol}^2$), produzindo, em seu interior, uma temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ 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.

4.1.4.2 Estufa para esterilização

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

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

² Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalo de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado plastificado.

4.1.4.3 Lâmpadas germicidas (ultravioleta)

São usadas na descontaminação dos porta-filtros, entre as sucessivas séries de filtrações e para esterilização das placas de Petri de plástico não autoclavável, usadas na técnica de membrana, filtrante.³

4.1.5 Equipamentos para filtração

4.1.5.1 Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5 atm.

4.1.5.2 Frasco Kitasato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada (usualmente 4 L), ou suporte especial para os porta-filtros.

4.1.5.3 Frasco Kitasato para proteção da fonte de vácuo, com capacidade adequada (usualmente 1 L), conectado ao frasco de filtração (ou ao suporte especial) e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou de látex de espessura adequada.

4.1.5.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável (ver Figura 1).

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 Microscópio estereoscópico binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros.

Nota: Para iluminação, usar lâmpadas de luz fluorescente branca (fria).

4.1.8 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 1 a 10°C.

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para conter a água de diluição tamponada a ser usada no enxágüe dos porta-filtros, durante a filtração das amostras.

³ A exposição a microondas é um processo alternativo para esterilização dessas placas (ver Norma Técnica CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia).

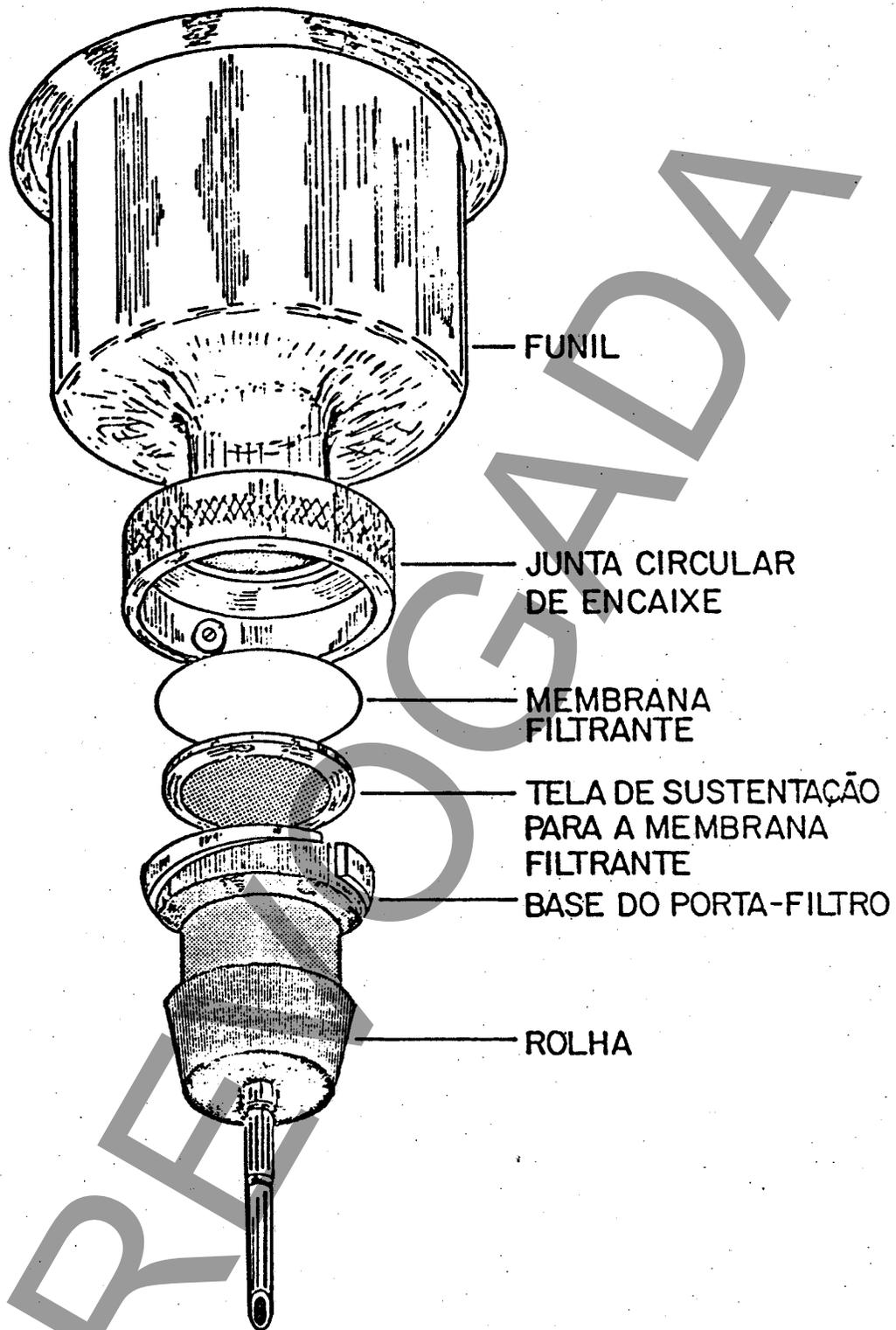


FIGURA 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração

4.2.2 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.

4.2.3 Provetas

Graduadas (100 mL) ou porta-filtros graduados com marcação externa.

4.2.4 Frasco para água de diluição

De borossilicato ou vidro neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.5 Pipetas

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

4.3 Outros materiais

4.3.1 Bicos de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.2 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.3 Estojo para pipetas

Usar estojo de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado, para acondicionamento das pipetas a serem esterilizadas. Opcionalmente, as mesmas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para a esterilização.

4.3.4 Membranas filtrantes

Com 47 mm de diâmetro e 0,45 μ m de porosidade, brancas, quadriculadas, estéreis.

4.3.5 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.6 Placas de Petri

De plástico não tóxico, bem vedadas, de 48 mm de diâmetro x 8,5 mm de altura.

4.3.7 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro ou aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer

substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.3.8 Tela de amianto

4.3.9 Tripé

4.3.10 Termômetros

4.3.11 Sacos plásticos

Utilizados para o acondicionamento das placas de Petri de plástico (contendo o meio de cultura e a membrana filtrante), quando a incubação deste material é efetuada em banho-maria. Esses sacos devem oferecer condições ótimas de vedação.

5 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

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 Ágar M-7 horas

5.1.1 Fórmula:

Proteose peptona nº 3 ou polipeptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Lactose.....	10,0 g
D-manitol.....	5,0 g
Cloreto de sódio p.a.....	7,5 g
Lauril sulfato de sódio.....	0,2 g
Desoxicolato de sódio.....	0,1 g
Púrpura de bromocresol.....	0,35 g
Vermelho de fenol.....	0,3 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: $7,3 \pm 0,1$	

5.1.2 Preparo:

Pesar os ingredientes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, com agitação constante, até a completa dissolução dos ingredientes, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Após a dissolução completa, aquecer por mais 5 minutos. Esfriar o meio a 55-60°C e ajustar o pH para $7,3 \pm 0,1$ com NaOH

0,1 N. Colocar em banho-maria a 45°C. Distribuir volumes de 4 a 5 mL em placas de Petri de plástico (48 x 8,5 mm) e deixar solidificar.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz à temperatura de 2 a 10°C, durante, no máximo, 1 mês. Após esse período, deverá ser descartado.

5.2 Água de diluição

5.2.1 Fórmula:

Solução-estoque A.....	1,25 mL
Solução-estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1 000 mL

5.2.2 Preparo:

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

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Distribuir volumes 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.⁴

b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

⁴ Antes da utilização da solução-estoque A deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

- c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a um litro de água destilada;
- d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 90 ± 2 mL;⁵
- e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

5.3 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.3.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40,0 g
Água recém-destilada.....	1 000 mL

5.3.2 Preparo:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 1 000 mL de água recém-destilada. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Princípio do método

Esta técnica baseia-se na filtração de volumes adequados de água, através de membrana filtrante com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. As bactérias a serem detectadas, apresentando dimensões maiores que os poros, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual é então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial (Ágar M-7 Horas). Por capilaridade, o meio difunde-se para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após o período determinado de incubação ($7 \text{ h a } 41,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), desenvolvem-se colônias com características típicas (coloração amarelo claro ao amarelo brilhante), que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópio. A partir da contagem destas colônias, calcula-se a densidade de coliformes fecais presentes na amostra (ver Figura 2).

6.2 Amostragem

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

⁵ A água de diluição a ser utilizada no enxágüe de porta-filtros, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões, em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização, por autoclavação, do volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 e 1 000 mL).

6.3 Amostra

6.3.1 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).

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

6.3.3 Agentes quelantes: para a colheita de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA (pH final: 6,5), para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, previne apenas a ação bactericida do cobre.

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

6.4 Desenvolvimento do ensaio

6.4.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes da mesma a serem filtrados, em função de sua procedência, segundo as especificações a seguir:

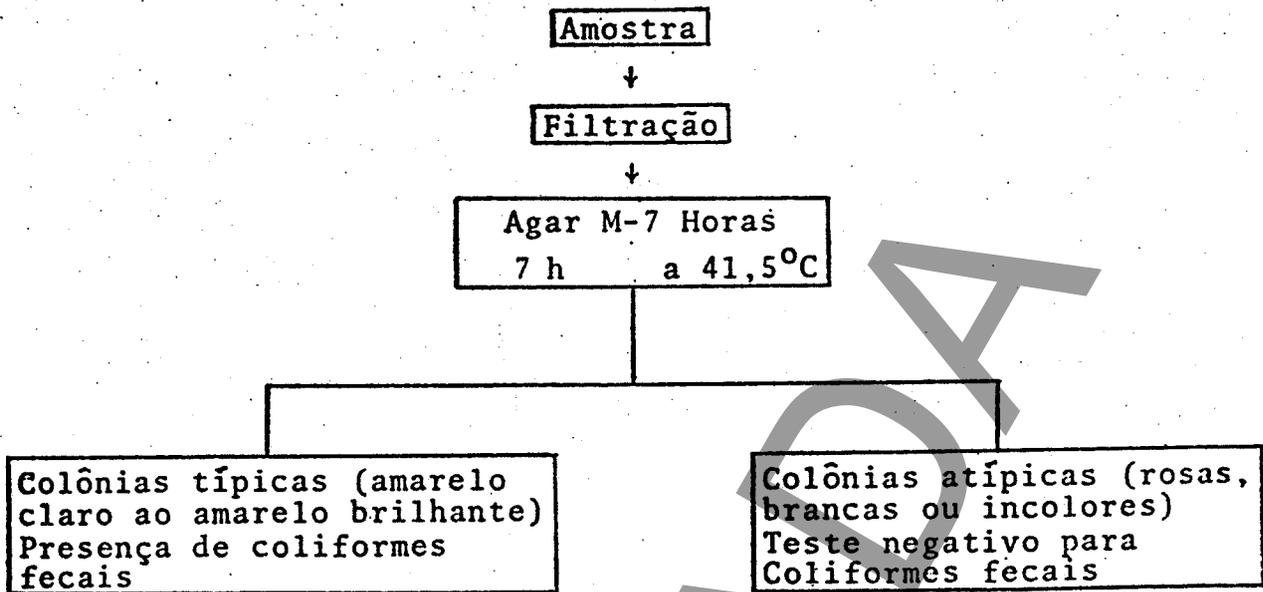


FIGURA 2 - Esquema do procedimento

- a) para águas destinadas ao consumo humano, é requerida a análise de um volume total de 100 mL da amostra, o qual é filtrado diretamente, no caso de águas tratadas;
- b) para águas brutas (poços, fontes, nascentes) ou águas com tratamento inadequado, pode ser requerida a subdivisão desse volume em volumes menores (2 de 50 mL; 4 de 25 mL; 70, 20 e 5 mL,.....);
- c) para águas superficiais marinhas ou doces, usualmente é requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra).

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

6.4.3 Disponibilizar sobre a mesma o seguinte material

- a) porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao frasco de filtração (ou a um suporte especial), o qual é conectado a um frasco Kitasato de segurança e este, à fonte de vácuo;
- b) placas de Petri, contendo o meio "Agar M-7 Horas", identificadas com os números das amostras que deverão conter;
- c) pinça com as extremidades mergulhadas em álcool etílico;
- d) bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;

- e) provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra, no caso de não se dispor de porta-filtro graduado com marcação externa;
- f) água de diluição tamponada estéril, contida em balões identificados com o número dos porta-filtros, para cujo enxágue serão utilizados; e
- g) membranas filtrantes estéreis, com 47 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 μm , brancas, quadriculadas.

6.4.4 Preparação do porta-filtro:

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com as extremidades de uma pinça previamente flambadas e resfriadas, colocar uma membrana filtrante estéril, sobre a parte inferior do porta-filtro;
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana.

6.4.5 Preparação da amostra para filtração:

6.4.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 20 mL:

- a) homogeneizar a amostra, 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; e
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas, ou então em porta-filtro com graduação e proceder à filtração como em 6.4.6.

6.4.5.2 Para volumes inferiores a 20 mL:

- a) adicionar ao porta-filtro 20 à 30 mL de água de diluição tamponada estéril (não é necessário medir o volume, pois este servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração);
- b) homogeneizar a amostra (como em 6.4.5.1-a) e, com auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume desejado e proceder à filtração como em 6.4.6.

6.4.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra):

- a) efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte for

ma:

- . proceder à identificação de cada frasco de água de di l u i ç ã o e s t é r i l, anotando o número da amostra e a dil u i ç ã o que deverá conter;
- . homogeneizar a amostra (como em 6.4.5.1-a) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL de amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada, assim, a pr im e i r a diluição (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma co r r e s p o n d e a o v o l u m e d e 0,1 mL da amostra;
- . repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e, desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, tr an s f er i r 10 mL para um novo frasco, previamente id en t i f i c a d o, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), se n d o que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra;
- . proceder dessa maneira, na seqüência das diluições de s e j a d a (10^{-3} , 10^{-4} 10^{-8}); e
- . após o preparo das diluições, preparar o porta-filtro como descrito em 6.4.4 e, após homogeneização da dil u i ç ã o selecionada para a filtração (conforme 6.4.5.1.-a), proceder à filtração como em 6.4.6.

6.4.6 Filtração da amostra

6.4.6.1 Verter cuidadosamente o volume da amostra a ser examinado no porta-filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas su p e r i o r e s do mesmo.

6.4.6.2 Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração.

6.4.6.3 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro duas vezes com po r ç õ e s de 20-30 mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

6.4.6.4 Desligar a fonte de vácuo, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante.

6.4.6.5 Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça cujas extremidades foram flambadas e resfriadas, retirar, com cuidado, a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à

inferior.

6.4.6.6 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado.

Nota: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar um movimento giratório da mesma, para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas, levantar a membrana na extremidade mais próxima à mesma para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo seu crescimento (ver Figura 3).

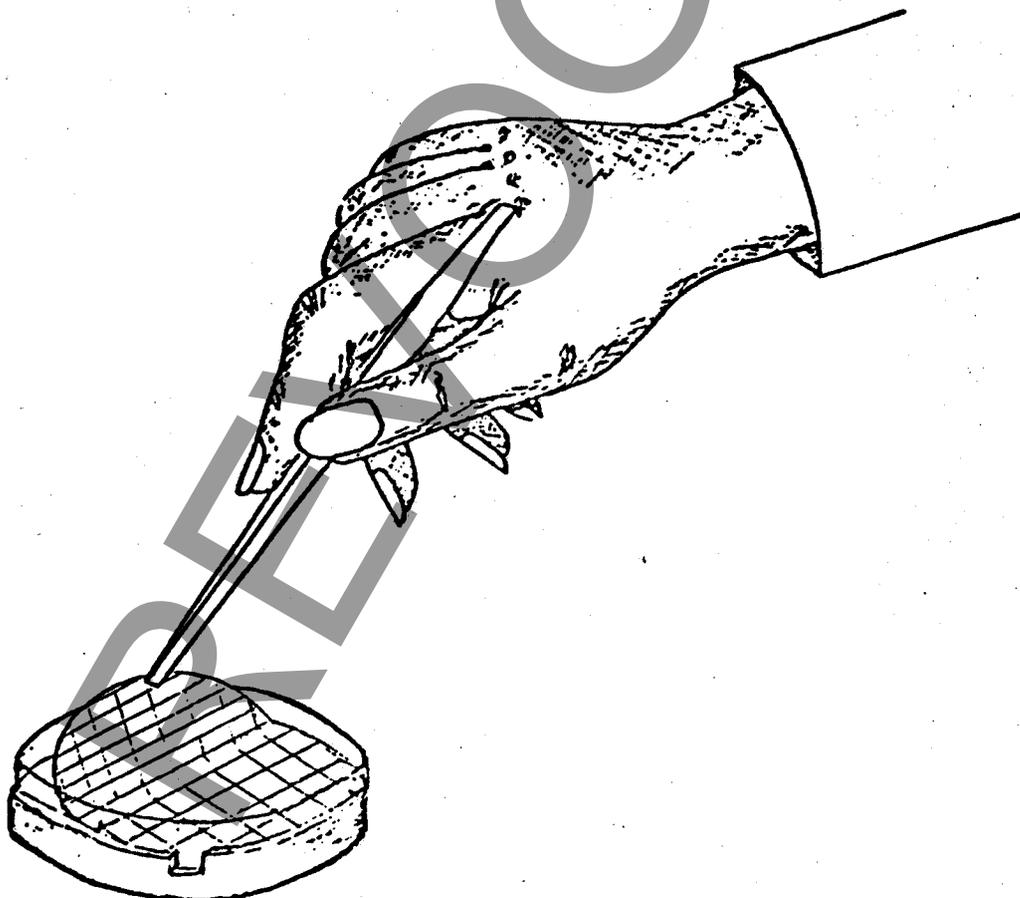


FIGURA 3 - Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

6.4.6.7 Tampar a placa de Petri.

6.4.6.8 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril segundo item 6.4.6.3 e proceder à filtração da próxima amostra.⁶

6.4.7 Após as filtrações, colocar as placas de Petri (contendo as membranas), em posição invertida, em bandejas, em cujo fundo foram colocadas folhas de papel toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água e incubar as placas a $41,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, durante 7 horas.⁷

6.4.8 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente, colocada em direção a mais próxima possível da perpendicular em relação ao plano da membrana, efetuar a contagem das colônias típicas de coliformes fecais (colônias com coloração que vai do amarelo-claro ao amarelo brilhante), considerando as seguintes observações:

6.4.8.1 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias típicas de coliformes fecais em Ágar M-7 Horas se situam entre 20 a 60, sendo que a contagem total (colônias típicas e atípicas) deve ser inferior a 200. Para essa contagem, observar as Figuras 4 e 5.

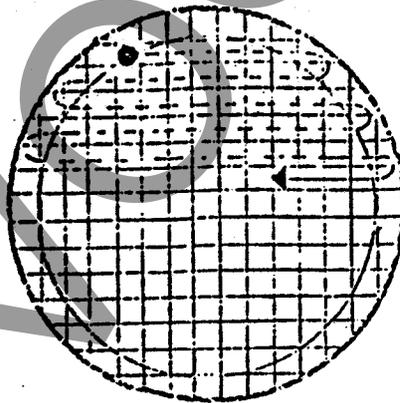


FIGURA 4 - Modelo para contagem das colônias (o círculo interior indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem)

⁶ Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtrações e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os mesmos devem ser esterilizados novamente, para evitar uma contaminação acidental. A rápida esterilização dos porta-filtros pode ser efetuada através da exposição a radiações ultravioleta durante 2 minutos ou imersão em água fervente durante, no mínimo, 30 minutos. Para o controle de esterilidade de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100 mL de água de diluição tamponada estéril antes da filtração das amostras e após 10 filtrações no mesmo porta-filtro.

⁷ A incubação pode ser feita em incubadoras que preencham os requisitos quanto à estabilidade da temperatura requerida, ou em banho-maria, onde as placas de Petri devem ser acondicionadas em sacos plásticos bem vedados, que devem ficar totalmente submersos na água, durante o período de incubação.

6.4.8.2 No caso de terem sido filtrados vários volumes, selecionar para leitura apenas aquele(s) que tiver(em) fornecido contagem de colônias dentro dos limites aceitáveis.

6.4.8.3 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, não considerar o limite mínimo e efetuar a leitura em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amostra.

6.4.8.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens superiores a 60, mas for possível efetuar a contagem no menor desses volumes, observar o exposto no item 7.2.4 para a expressão dos resultados.

6.4.8.5 Quando todos os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo o item 7.2.2.

6.4.8.6 Quando a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), expressar o resultado segundo item 7.2.3.⁸

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo

7.1.1 A partir da contagem de colônias típicas de coliformes fecais, nas placas selecionadas para a leitura (20 a 60 colônias típicas) em Ágar M-7 Horas, calcular a densidade de coliformes fecais/100 mL, através da aplicação da seguinte fórmula geral:

$$\text{Nº de colônias de coliformes fecais/100 mL} = \frac{\text{nº de colônias típicas}}{\text{volume filtrado da amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado, conforme item 6.4.8.3, calcular a densidade em 100 mL através da seguinte fórmula:

$$\text{Nº de colônias de coliformes fecais/100 mL} = \frac{\text{soma das colônias típicas}}{\text{soma dos volumes correspondentes às contagens (mL)}} \times 100$$

⁸ Nestes casos, deve-se solicitar a coleta da amostra e selecionar volumes mais adequados para a filtração, visando obter contagens dentro dos limites aceitáveis (20 a 60 colônias).

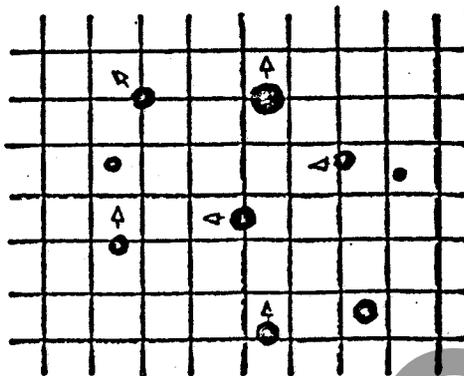


FIGURA 5 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento (as colônias são contadas nos quadrados indicados pelas setas)

Exemplos:

- . volumes filtrados: 4 de 25 mL
- . contagens: 16, 21, 17 e 14
- . cálculo da densidade em 100 mL:

$$\frac{(16 + 21 + 17 + 14)}{(25 + 25 + 25 + 25)} \times 100 = 68$$

- . volumes filtrados: 70, 25 e 5 mL
- . contagens: crescimento confluyente, 70 e 20
- . cálculo da densidade em 100 mL

$$\frac{(70 + 20)}{(25 + 5)} \times 100 = 300$$

7.1.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero e esses volumes não totalizarem 100 mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e utilizar a fórmula geral apresentada no item 7.1.1 para o cálculo da densidade de coliformes fecais em 100 mL e item 7.2.2.2 para a expressão dos resultados.

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de coliformes fecais, determinada através da técnica de membrana filtrante, é expressa como:

Nº de colônias de coliformes fecais em 100 mL.

7.2.2 Quando o(s) volume(s) filtrado(s) fornece(m) contagem igual a

zero, há dois casos a serem considerados:

7.2.2.1 Quando o(s) volume(s) filtrado(s) totaliza(m) 100 mL: neste caso, expressar o resultado como:

Nº de colônias de coliformes fecais/100 mL: < 1

7.2.2.2 Quando o(s) volume(s) filtrado(s) não totaliza(m) 100 mL: neste caso, observar o exposto no item 7.1.3, para o cálculo do resultado, expressando o valor obtido precedido do sinal < (menor que):

Nº de colônias de coliformes fecais em 100 mL: < valor obtido

7.2.3 Quando a contagem não for efetuada, devido ao grande número de colônias desenvolvidas na membrana (>200) ou à ocorrência de crescimento confluyente, expressar o resultado como:

Contagem prejudicada

Nota: Nos casos relativos a crescimento confluyente, especificar, na expressão dos resultados:

Contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

7.2.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneçam contagens superiores a 60, mas for possível efetuar a contagem no menor volume, expressar o resultado precedido do sinal > (maior que):

Nº de colônias de coliformes fecais em 100 mL: > valor obtido

/ANEXO A

ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

A-1 Vantagens da técnica de membrana filtrante

Esta técnica tem maior precisão que a técnica de tubos múltiplos, proporcionando maior reprodutibilidade de resultados. Além disso, através dela podem ser examinados volumes bem maiores da amostra, em relação aos examinados pela técnica de tubos múltiplos. Uma vantagem bastante apreciável, quando se trata do controle de qualidade de águas destinadas ao abastecimento público, é a maior rapidez na obtenção de resultados em comparação com a técnica dos tubos múltiplos. Isto é particularmente importante, pois permite que, a partir da contagem de colônias, seja lançado um alerta às entidades responsáveis pela tomada de providências necessárias.

Além disso, a utilização desta técnica propicia:

- . redução no tempo requerido para a preparação dos meios de cultura e da vidraria;
- . economia de espaço na incubadora;
- . redução no tempo requerido para as operações de incubação, leitura e repicagem de culturas.

Disto resulta o aumento da capacidade do laboratório em termos de número de amostras por dia, sem aumentar a quantidade de horas-homem dispendidas, nem de meios de cultura necessários. Esta técnica permite, ainda, a filtração de amostras no campo ou em localidades distantes do laboratório.

A-2 Limitações da técnica de membrana filtrante

Esta técnica apresenta algumas limitações (em geral não associadas à aplicação no controle de águas potáveis), que impedem sua utilização em várias situações, como substituta da técnica de tubos múltiplos para a quantificação de coliformes. Existem vários fatores responsáveis por essas limitações e os mais importantes serão expostos a seguir.

A-2.1 Materiais em suspensão

A presença de materiais em suspensão pode limitar a aplicação da técnica de membrana filtrante para qualquer amostra, pois o crescimento dos coliformes pode apresentar-se como uma película contínua sobre a superfície da membrana, impossibilitando a contagem. Essa limitação depende do volume a ser filtrado, da espessura da camada de material retido sobre a membrana e também do tipo de material em sus

pensão. Assim, camadas relativamente delgadas de materiais higroscópicos, como ferro, manganês, alumínio ou algas, podem obstruir os poros da membrana, ao passo que camadas mais espessas de materiais cristalinos ou silicosos podem causar pouca ou nenhuma dificuldade. Quando uma amostra de água apresentar alta turbidez, mas se sabe que a população de coliformes é elevada, esse problema pode ser eliminado através da filtração de pequenos volumes da amostra; no entanto, se a densidade destas bactérias é baixa, deve-se dar preferência à utilização de outra técnica, pois volumes pequenos conteriam um número pouco significativo de coliformes.

A-2.2 População elevada de outros grupos de bactérias

A presença de grande quantidade destas bactérias pode impedir a detecção de coliformes, produzindo um crescimento maciço na superfície da membrana, que mascara a detecção visual das colônias de coliformes. No caso de águas tratadas, ao se observar um crescimento excessivo de bactérias, o qual interfere no teste de membrana filtrante, deve-se submeter a amostra a uma contagem de colônias de bactérias heterotróficas. Se o número dessas bactérias exceder a 500 por mL, o operador da estação de tratamento de água deverá ser alertado, no sentido de detectar a causa da alta densidade de organismos não coliformes, para tomar as providências necessárias.

A-2.3 Presença de metais pesados

Há águas altamente poluídas com resíduos industriais, que podem conter mais que 1 mg/L de zinco ou cobre; estes íons, que exercem uma ação bactericida ou bacteriostática, podem ser adsorvidos à membrana e, assim, impedir o crescimento bacteriano, ocasionando resultados irregulares para os organismos pesquisados. Em amostras deste tipo, recomenda-se a adição de um agente quelante (EDTA) ao frasco, antes de se efetuar a colheita da amostra.

A-2.4 Presença de fenóis ou metais tóxicos

Esgotos submetidos apenas ao tratamento primário, seguido de cloração, ou esgotos contendo fenóis ou metais tóxicos, provenientes de resíduos industriais, não podem ser analisados pela técnica da membrana filtrante. Essas amostras freqüentemente apresentam densidade temporariamente reduzida de coliformes e sua detecção exigiria a filtração de volumes tais que a retenção dos elementos tóxicos na superfície da membrana impediria o crescimento dessas bactérias.

A-2.5 Presença de algas

A presença de algas nas amostras impossibilita a utilização da técnica

nica de membrana filtrante, devido à obstrução dos poros da membrana, formando uma película em sua superfície, que pode impedir o crescimento ou a visualização das colônias.

A-3 Fatores intervenientes na escolha da técnica da membrana filtrante

A decisão na escolha da técnica de membrana filtrante para determinar a qualidade de água, do ponto de vista bacteriológico, deve levar em conta os seguintes fatores:

- . aplicabilidade do exame às águas a serem examinadas;
- . disponibilidade de equipamentos e materiais de boa qualidade;
- . habilidade técnica do pessoal do laboratório;
- . conveniência;
- . fatores econômicos; e
- . atitudes administrativas.

Para optar por essa técnica, é fundamental demonstrar que os resultados são equivalentes aos fornecidos pela técnica de tubos múltiplos. A comparação inicial entre as duas técnicas, antes da implantação da técnica de membrana filtrante, é indispensável, pois a não equivalência de resultados pode indicar a inadequação dos equipamentos, das membranas filtrantes, dos meios de cultura ou, ainda, a necessidade de intensificação do treinamento dos profissionais envolvidos.

/ANEXO B

REVOGADA

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

B-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

B-2 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade e livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos. Ver Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

B-3 Armazenamento de meios de cultura desidratados

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

B-4 Cuidados no preparo de meios de cultura

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

B-5 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle de qualidade de meios de cultura a serem empregados na determinação de coliformes pela técnica de membrana filtrante. Ver Norma CETESB L5.216- Controle de qualidade de meios de cultura.

B-6 Membranas filtrantes

B-6.1 Qualidade das membranas filtrantes

Para aplicações microbiológicas, as membranas filtrantes devem proporcionar uma completa retenção das bactérias em sua superfície e velocidade de filtração satisfatória. Devem, ainda, ser resistentes ao uso, livres de glicerina e não devem apresentar áreas hidrofóbicas. As dificuldades básicas encontradas com membranas filtrantes normalmente se relacionam com a distribuição dos poros, presença de

áreas hidrofóbicas, toxidez da tinta empregada na impressão do quadriculado em sua superfície e com o próprio material empregado em sua confecção.

B-6.2 Poros

Os poros da membrana filtrante devem ser uniformes em diâmetro e apresentar-se uniformemente distribuídos. Poros com diâmetros irregulares determinam diferenças na velocidade de filtração em diferentes áreas da membrana. A membrana deve ser livre de áreas não porosas que impeçam a difusão de nutrientes para sua superfície pois qualquer célula bacteriana retida em tais áreas não se desenvolverá por falta de nutrientes.

B-6.3 Tipo de tinta empregada na impressão do quadriculado

Algumas tintas utilizadas para essa finalidade têm ação bactericida ou bacteriostática. Tais efeitos podem ser reconhecidos através da inibição do crescimento das colônias nas áreas adjacentes às linhas do quadriculado. Estas inibições no crescimento das colônias podem ainda ser derivadas da utilização de tintas hidrofóbicas, que impedem a difusão do meio de cultura para áreas em que a mesma foi empregada. A impressão do quadriculado na superfície da membrana não deve ser muito forte, pois disto pode resultar a ruptura da membrana nessas linhas, propiciando o crescimento confluyente nos canais que se formam. Portanto, a impressão do sistema quadriculado em sua superfície deve ser feita com tinta que não estimule ou iniba o desenvolvimento normal das colônias. Além disso, as membranas devem permanecer inertes às reações bacterianas e inalteráveis em suas características físico-químicas que podem afetar a seletividade e sensibilidade do meio de cultura.

B-6.4 Esterilização das membranas filtrantes

A esterilização das membranas filtrantes é essencial em todas as aplicações envolvendo filtração de líquidos para a remoção de bactérias e para uso na quantificação de bactérias pela técnica de membrana filtrante.

Usualmente, as membranas filtrantes são embaladas individualmente, ou acondicionadas em envelopes fechados, contendo 10 (dez) unidades, sendo pré-esterilizadas pelo fabricante, estando, portanto, prontas para uso. Quando isto não ocorre, a esterilização deve ser feita através de autoclavação a 121°C, durante 10 (dez) minutos; imediatamente após este período, deve-se efetuar a exaustão do vapor da autoclave e as membranas devem ser prontamente removidas para mi

nimizar sua exposição ao calor. A exposição excessiva das membranas filtrantes às temperaturas de esterilização pode determinar o fechamento dos poros, disto decorrendo a não uniformidade na velocidade de filtração em toda a área da membrana; além disso, as membranas podem se tornar mais frágeis e quebradiças.

Comercialmente, a pré-esterilização das membranas filtrantes pode ser feita através de autoclavação, radiação gama ou exposição a óxido de etileno. Um estudo comparativo, relativo à avaliação de membranas filtrantes pré-esterilizadas, demonstrou haver um aumento significativo na taxa de recuperação bacteriana em membranas esterilizadas por autoclavação em relação a membranas esterilizadas por exposição a óxido de etileno, sugerindo a presença de resíduos tóxicos nas membranas esterilizadas por esse último método. Neste sentido, para laboratórios que estão utilizando membranas filtrantes pré-esterilizadas por óxido de etileno, é aconselhável que alguns pacotes de membrana do lote em uso sejam autoclavadas no laboratório, para uma posterior comparação com as membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno, através da aplicação de teste de recuperação bacteriana, utilizando culturas puras de bactérias. Este teste irá evidenciar se resíduos tóxicos ainda estão presentes nas membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno e, se isto ocorrer, é recomendável que todo lote seja submetido a uma autoclavação a 121°C durante 10 (dez) minutos, antes de sua utilização em laboratório.

B-6.5 Tempo de armazenamento de membranas filtrantes

Quanto ao tempo de armazenamento das membranas filtrantes, recomenda-se um período máximo de 12 meses, pois podem ocorrer alterações em suas características físicas com o decorrer do tempo, determinando perda da flexibilidade, havendo ruptura da membrana nos pontos de pressão criados durante a manipulação; além disso, durante a filtração, freqüentemente ocorre curvatura das bordas da membrana, impedindo o contato com o substrato.

B-6.6 Cuidados especiais com as membranas filtrantes

As membranas filtrantes são facilmente danificadas. Em sua manipulação, deve-se segurá-las sempre pela sua parte periférica, usando pinças adequadas, com as extremidades arredondadas. Antes do uso, deve-se imergir as extremidades dessas pinças em álcool para posterior flambagem.

B-7 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 autocl^uvação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24-48 horas. Se houver mudança de coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-8 Cuidados especiais na esterilização rápida de porta-filtros

A esterilização dos porta-filtros através de imersão em água fervente é uma prática arriscada, que pode levar a sérias queimaduras, devido a respingos e derramamentos. Portanto, para a rápida esterilização dos porta-filtros, entre cada série de amostras filtradas no mesmo porta-filtro, deve-se dar preferência à exposição a radiação ultravioleta.

B-9 Lâmpadas germicidas ultravioleta (U.V.)

B-9.1 Características gerais

São lâmpadas que emitem radiações ultravioleta com ação germicida. A luz ultravioleta inclui radiações entre 150 e 4 000 Angstroms (Å), mas radiações inferiores a 1800 Å são absorvidas pelo oxigênio atmosférico, não tendo, portanto, aplicação para esterilização. O efeito mais potente para a morte de microrganismos ocorre a 2600 Å. As lâmpadas germicidas comerciais emitem primariamente 2537 Å, que tem 85% da capacidade germicida das radiações de 2600 Å.

B-9.2 Avaliação da eficiência na esterilização

Embora a vida média de uma lâmpada U.V. possa ser de 5000 horas, na prática esse tempo depende primariamente das características individuais das lâmpadas e do número de vezes que a mesma é utilizada. Assim, a simples manutenção do log do número de horas de operação, bem como sua comparação com o tempo-limite recomendado pelo fabricante, é de valor questionável como único controle na avaliação da eficiência das lâmpadas germicidas no processo de esterilização. Para um controle efetivo, as lâmpadas devem ser testadas quinzenalmente com um medidor de luz U.V. (luxímetro) e substituídas se estiverem emitindo menos que 80% de sua capacidade inicial. É recomendada também, para essa avaliação, a realização de teste bacteriológico específico, sendo a seguinte a seqüência de procedimento para sua execução:

- a) preparar "Plate Count Agar" em quantidade adequada para o número de placas necessárias para o teste e distribuir volumes de 10 a 15 mL do meio fundido em placas de Petri de 15 mm x 150 mm. Manter essas placas ligeiramente abertas

em ambiente asséptico, até que o meio se solidifique e a água de condensação evapore. Fechar as placas e mantê-las em refrigerador até o momento do uso. (Obs.: Ver Norma CETESB L5.201, para informações quanto à composição e preparo do "Plate Count Agar");

b) preparar uma série de diluições de uma cultura de uma bactéria do grupo coliforme, de modo a obter uma diluição tal que um inóculo de 0,5 mL da mesma forneça contagem de 200 a 250 microrganismos. (Obs.: Ver Norma CETESB L5.215 para informações quanto ao preparo da suspensão bacteriana e diluições da mesma);

c) para a realização do teste, pipetar 0,5 mL da diluição selecionada (contagem de 200 a 250 microrganismos) na superfície do "Plate Count Agar" contido em placas preparadas segundo especificado no item a;

d) a seguir, com todos os cuidados de assepsia, efetuar o espalhamento do inóculo sobre a superfície do "Plate Count Agar". Para isso, proceder da seguinte maneira:

- . colocar uma alça de Drigalski em um recipiente com álcool etílico. Removê-lo e passar por uma chama.
- . após todo álcool ter sido queimado, deixar esfriar durante 15 segundos e, antes de efetuar o espalhamento, testar se a temperatura da alça é segura para uso, tocando com a mesma o "Plate Count Agar", nas bordas da placa de Petri em que o mesmo está contido.
- . após essa verificação, efetuar o espalhamento, posicionando a alça de Drigalski perpendicularmente à superfície do ágar, no ponto em que o inóculo foi depositado. Mantendo a placa parada, efetuar movimentos circulares com a alça, até o completo espalhamento do inóculo sobre toda a superfície do meio de cultura.
- . após ter sido usada, colocar a alça de Drigalski em solução desinfetante.

e) após o espalhamento, colocar cada placa inoculada sob a luz ultravioleta, nos pontos em que se deseja verificar sua eficiência na esterilização, mantendo-as abertas durante dois minutos. Como controle, separar uma das placas inoculadas, mantendo-a aberta sob a luz comum do laboratório, pelo mesmo período.

- f) fechar as placas e incubá-las a 35°C durante 24 horas; e
- g) após esse período de incubação, efetuar a contagem em todas as placas. A placa-controle deve conter 200-250 colônias e, nas placas irradiadas por luz ultravioleta, é esperada uma redução mínima de 99% em relação à contagem obtida na placa-controle. Se essa redução for inferior a 80%, a lâmpada ultravioleta em teste deve ser substituída.

/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. 17 ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989.
- C-2 CETESB. Avaliação de métodos para quantificação de coliformes totais e fecais. São Paulo, 1980.
- C-3 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216, 1ª revisão).
- C-4 _____. Guia de coleta e preservação de amostras de água, da CETESB. São Paulo, 1988.
- C-5 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo 1986, (Norma Técnica M1.001, 1ª revisão).
- C-6 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).
- C-7 REASONER, D.J.; BLANNON, J.C. & GELDREICH, E.E. Rapid seven-hour fecal coliform test. Appl. Environ. Microbiol., 38(2): 229-236, 1979.