



NORMA TÉCNICA

L5.204

Nov/1988
37 PÁGINAS

Fungos - contagem e isolamento em amostras de águas, esgotos e resíduos sólidos: 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	FUNGOS – CONTAGEM E ISOLAMENTO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS, ESGOTOS E RESÍDUOS SÓLIDOS	L5.204
	Método de ensaio	NOV/88

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	3
2 Normas complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	5
5 Execução do ensaio.....	12
6 Resultados.....	17
Anexo A – Identificação dos fungos.....	19
Anexo B – Meios de cultura alternativos para isolamento e conta gem de fungos em águas, esgotos e resíduos sólidos...	23
Anexo C – Pré-secagem do meio de cultura a ser utilizado na téc nica de "Spread Plate".....	29
Anexo D – Recomendações de ordem geral.....	33
Anexo E – Referências bibliográficas.....	35

INTRODUÇÃO

Até recentemente, pouca atenção tinha sido dada à ocorrência, distribuição e significado ecológico dos fungos no ambiente aquático. Porém, com o aumento de conhecimentos a respeito da presença e significado destes organismos e sua importância na determinação da qualidade de água, tornou-se evidente que os fungos não podem ser considerados como membros passivos da população microbiana aquática; suas atividades na água como organismos indicadores, como patógenos humanos e de vegetais, como fonte de nutrientes para a microfauna, como agentes nos processos de autodepuração da água, mineralização da matéria orgânica e formação de sedimentos, enfatizam a importância de seu estudo.

Apesar de ser o solo o habitat mais comum dos fungos, muitos dos grupos inferiores (Mastigomycotina e Zygomycotina) são quase inteiramente aquáticos. Estes ocorrem na superfície de materiais de origem animal ou vegetal em decomposição, em ambientes marinhos ou de água doce e alguns são parasitas de algas, protozoários ou raízes de plantas superiores. Entre os fungos superiores as classes mais representativas encontradas na água são os ascomicetos e deuteromicetos (fungos imperfeitos); os basidiomicetos apresentam pouca importância

no ambiente aquático.

A associação entre o número de fungos e a quantidade de matéria orgânica sugere a possibilidade da utilização destes organismos como indicadores de poluição. Entretanto, até o momento não existe nenhuma espécie isolada ou grupos de fungos que possam ser considerados importantes para esta finalidade. Existem alguns casos especiais, como por exemplo a utilização da levedura Candida krusei como indicador da presença de resíduos industriais provenientes da fabricação de papel, uma vez que tais materiais possuem grande quantidade de pentoses facilmente assimiláveis por esta levedura. Alguns autores sugerem ainda a possibilidade do emprego de leveduras e bolores termófilos, ou seja, que crescem a temperaturas elevadas, como indicadores de poluição térmica.

O isolamento de fungos patogênicos ao homem e animais superiores tem sido raro tanto em águas poluídas como em estações de tratamento de águas, podendo citar o Geotrichum candidum, Aspergillus fumigatus e Petriellidium boydii, responsáveis respectivamente pela cromomicose, aspergilose pulmonar e micetoma eumicótico. O reservatório natural desses fungos zoopatogênicos é o solo, portanto a sua presença nessas águas está relacionada com o carreamento de solo por águas de enxurrada.

Embora exista uma ampla variedade de métodos para a detecção de fungos na água, esgoto e resíduos sólidos, nenhuma técnica padrão para sua contagem e isolamento foi desenvolvida. Têm sido usado com sucesso o método de contagem em placas através das técnicas de "spread plate" e "pour plate", normalmente empregadas na contagem de bactérias em amostras de água e sedimento. Este método permite estimar a população de fungos presentes na água, esgoto ou resíduos sólidos que tenha a capacidade de se desenvolver nas condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação definidos. Portanto, é impossível obter uma contagem "total", pois os diferentes tipos de amostras contém diferentes grupos de fungos, cujas necessidades de nutrição, umidade, aeração e temperatura ótima para o desenvolvimento são variáveis. Normalmente, utiliza-se um meio seletivo sólido que permite o desenvolvimento de uma grande variedade de fungos e, ao mesmo tempo, limita o crescimento radial das colônias e inibe o crescimento de bactérias e actinomicetos.

A enumeração quantitativa de fungos não é equivalente à de bactérias unicelulares porque uma colônia de fungo pode se desenvolver de uma única célula (esporo), de um agregado de células (um grumo de esporos).

ros ou de um esporo multicelular único), ou de fragmentos de um micélio ou pseudomicélio (contendo mais de uma célula viável). Para a contagem desses microrganismos assume-se que cada colônia de fungo desenvolvida em cultura de laboratório é originária de uma única unidade formadora de colônia (UFC) a qual pode ou não ser uma célula única.

1 OBJETIVO

Esta norma prescreve o método para isolamento e contagem de fungos em água de lagos, estuários, mar, corpos d'água receptores, resíduos sólidos, despejos industriais e domésticos, através das técnicas de "pour plate" e de "spread plate".

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;
- b) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- d) Guia de orientação para coleta e preservação de amostras (CETESB);
- e) L5.520 - Candida albicans - Determinação pela técnica de membrana filtrante.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.12.

3.1 Fungos

São protistas superiores que produzem esporos, não possuem clorofila e são incapazes de sintetizar seus alimentos. Conseqüentemente, dependem de outros organismos para completar a sua nutrição. Podem viver em matéria orgânica já morta causando e/ou auxiliando sua decomposição. Podem parasitar outros seres vivos alimentando-se do protoplasma das células hospedeiras e também formar associações com outras plantas, como as algas ou com raízes vegetais superiores. São subdivididos em bolores e leveduras.

3.2 Bolor (fungo filamentoso)

O fungo filamentoso apresenta micélio ou talo pluricelular, o qual é responsável pelo crescimento e pode também cumprir funções de re

produção.

3.3 Levedura

Fungo cuja forma de desenvolvimento normal e dominante é unicelular e não filamentosa; ocorrem com frequência em locais ricos em substâncias fermentáveis.

3.4 Fungos aquáticos

Fungos que somente se desenvolvem em ambientes aquáticos.

3.5 Esporo

Órgão de reprodução dos fungos, pode ser sexuado ou assexuado, sendo de grande importância na classificação do fungo.

3.6 Hifa

Cada filamento que constitui o micélio ou talo pluricelular.

3.7 Micélio ou talo pluricelular

Conjunto de filamentos (hifas) que se desenvolvem a partir de um esporo e constituem o corpo do fungo. Pode ser filamento contínuo ou tabicado.

3.8 Técnica de "pour plate"

Técnica que consiste na adição do meio de cultura em estado líquido ao inóculo da amostra, sendo requerida a estabilização da temperatura do mesmo na faixa de 44-46°C antes dessa adição, para evitar a solidificação do mesmo, devido à presença de ágar em sua composição.

3.9 Técnica de "spread plate"

Técnica que consiste no espalhamento de um inóculo da amostra (máximo de 0,5 mL) na superfície de um meio de cultura sólido, sendo requerida uma desidratação prévia do meio de cultura após sua distribuição em placas, para permitir uma absorção adequada do inóculo.

3.10 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

3.11 p.a.

Para análise.

3.12 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Estufa para esterilização e secagem

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

4.1.2 Autoclave

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

4.1.3 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja $20-24^{\circ}\text{C}$, com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa a ser colocada em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C .

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para manutenção da temperatura na faixa de $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com capacidade suficiente para comportar recipientes con

tendo o meio de cultura a ser empregado na técnica de "pour plate", o qual, após fusão prévia, deve ter sua temperatura estabilizada nessa faixa até o momento do uso. Para verificar a temperatura, deve ser utilizado termômetro com graduação e escala adequadas e registros periódicos devem ser efetuados.

4.1.5 Placa rotatória ("rota-plate")

Equipamento adequado para imprimir um movimento de rotação em velocidade adequada (50 rpm) a placas de Petri contendo o meio de cultura sólido em seu interior.

Obs.: Equipamento usado na técnica de "spread plate".

4.1.6 Contador de colônias

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

4.1.7 Câmara de segurança biológica

Equipamento que possibilita a remoção de partículas presentes no ar através da passagem do mesmo através de um filtro adequado, sendo o ar filtrado dirigido em forma de um fluxo direto sobre a área de trabalho.

Obs.: Equipamento de uso opcional, podendo o teste ser realizado em ambiente que proporcione o grau de assepsia requerido.

4.1.8 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana.

4.1.9 Potenciômetro

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

4.1.10 Balança

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

4.1.11 Refrigerador

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

dicamente.

4.2 Materiais

4.2.1 Materiais para preparação de meios de cultura

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

4.2.2 Frascos para coleta de amostras

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

4.2.3 Frascos para água de diluição

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

4.2.4 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 0,1, 1,0 e 10,0 mL com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel. São esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante duas horas.

4.2.5 Porta-pipetas de aço inoxidável

4.2.6 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de 15 mm x 150 mm e 18 mm x 180 mm. Para a técnica de "pour plate", devem ser utilizados tubos de borossilicato (pyrex) com tampa de rosca de material não tóxico, com capacidade para conter 12 a 15 mL do meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 15 x 150 mm).

4.2.7 Placas de Petri

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

4.2.8 Bastonetes de vidro (alças de Drigalski)

Com 4 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento, apresentando, a 4 cm de uma das extremidades, uma inclinação de 45°.

4.2.9 Caixas de aço inoxidável

Com dimensões de 50 cm x 30 cm x 20 cm.

4.2.10 Bico de Bunsen

Com funcionamento adequado para permitir uma combustão completa.

4.2.11 Tripé4.2.12 Tela de amianto

Com dimensões de 22 cm x 22 cm.

4.2.13 Bandejas de plástico ou aço inoxidável4.3 Reagentes

4.3.1 Para preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas nesse ensaio, são os seguintes os reagentes necessários:

- . Ácido fênico;
- . Ácido láctico;
- . Ágar;
- . Batata;
- . Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) p.a.;
- . Dextrose;
- . EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) p.a.;
- . Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.;
- . Glicerina;
- . Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- . Lactofenol "Cotton blue";
- . Neopeptona;
- . Tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) p.a.

4.3.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

4.4 Meios de cultura4.4.1 Agar Sabouraud DextroseFórmula:

Dextrose.....	40,0 g
Neopeptona.....	10,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $5,6 \pm 0,1$	

Preparo:

Para o preparo desse meio, pesar 65,0 g do meio desidratado "Sabouraud Dextrose Agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar 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. Ajustar o pH para 5,6. Após esse preparo observar as especificações a seguir para a distribuição do meio de cultura, em função do seu uso posterior:

- a) Para uso em exames pela técnica de "spread plate" - Esterilizar o meio em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter a solução preparada em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 15 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri, contendo o agar Sabouraud Dextrose, podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 4 semanas.
- b) Para uso em exames pela técnica de "pour plate" - Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de aproximadamente 10 a 12 mL do agar Sabouraud Dextrose em tubos de 15 mm x 150 mm com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação e solidificação os tubos contendo o meio podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C), durante um período máximo de 4 semanas.

4.4.2 Agar Batata DextroseFórmula:

Batata (cozida).....	250,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Agar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 5,6 ± 0,1	

Preparo:

Para o preparo dessa solução, pesar 250 g de batata, descascar, cortar e colocar em um béquer. Adicionar 100 mL de água destilada fria e cozinhar por um período de 40 minutos. Filtrar em gase com todos os cuidados de assepsia. Adicionar ao filtrado a dextrose, o agar e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Ajustar o pH para 5,6 ± 0,1. Distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em tu

bos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 4 semanas.

4.5 Soluções

4.5.1 Água de diluição

Fórmula:

Solução estoque A.....	1,25 mL
Solução estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,1$	

Preparo:

A água de diluição deve ser preparada como segue:

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

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

Para esse preparo, dissolver o fosfato monopotássico em 50 mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,1$ com solução de hidróxido de sódio 1 N e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira;

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

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	81,1 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

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

c) adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a 1 litro de água destilada;

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

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

4.5.2 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH - 1 N)

Fórmula:

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

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

4.5.3 Solução de tiosulfato de sódio a 1,8%

Fórmula:

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.....	18,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para coleta de amostra de águas tratadas, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,1 mL dessa solução para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

4.5.4 Solução de EDTA a 15%

Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).....	150 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para coleta de amostras de águas suspeitas de conter metais pesados, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,3 mL dessa solução para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

Nota: Além da solução de EDTA, no volume especificado acima, deve ser adicionado aos frascos de coleta dessas amostras, 0,1 mL de uma solução de tiosulfato de sódio a 10% para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

4.5.5 Solução de lactofenol Cotton Blue (Lactofenol de Ammann)

Fórmula:

Ácido fênico.....	20,0	g
Ácido lático.....	20,0	mL
Glicerina.....	40,0	mL
Cotton blue (azul de algodão ou azul de Porrier).....	0,05	g
Água destilada.....	20,0	mL

Preparo:

Para o preparo dessa solução, misturar 20 mL de ácido lático, 40 mL de glicerina em 20 mL de água destilada fria. Adicionar o ácido fênico e aquecer a solução agitando frequentemente, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Adicionar o corante "cotton blue". Filtrar em papel. Armazenar em frasco bem vedado.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

A contagem e isolamento dos fungos em uma amostra baseia-se no princípio de que, definindo condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, se houver fungos viáveis na água, esgoto e resíduos sólidos, que possam se desenvolver nas condições estabelecidas, haverá formação de colônias, que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para isso, volumes adequados da amostra são inoculados em placas de Petri com posterior adição do meio de cultura fundido Agar Sabouraud Dextrose (técnica de "pour plate") ou são inoculados na superfície desse meio de cultura já solidificado, contido em placas de Petri, com posterior espalhamento do inóculo (técnica de "spread plate"). Após o período determinado de incubação, é feita a contagem das unidades formadoras de colônias de fungos, com auxílio de um contador tipo Quebec ou similar.

5.2 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de orientação para coleta e preservação de amostras (CETESB).

5.2.1 Amostra

5.2.1.1 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 ne

cessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

5.2.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco da coleta, 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.

5.2.1.3 Agentes quelantes: para a coleta de amostras de águas poluídas, 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 (volume 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.

5.2.1.4 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 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.

5.3 Procedimento a partir de amostras líquidas (água e esgoto)

5.3.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório ou a câmara de segurança biológica, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.3.2 Preparar placas de Petri em duplicata para cada volume da

amostra a ser inoculado e proceder à identificação das mesmas, anotando, na tampa de cada placa, o número designado pelo laboratório para a amostra, o volume a ser inoculado, a data e o tipo de água.

5.3.3 Homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço. Para essa finalidade pode ser utilizado também um homogeneizador mecânico.

5.3.4 Após a homogeneização da amostra, proceder conforme 5.3.4.1 ou 5.3.4.2 dependendo da técnica a ser utilizada.

5.3.4.1 No caso de se adotar a técnica de "pour plate", proceder da seguinte forma:

- a) com uma pipeta estéril de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir volumes em duplicata de 1 mL e 0,1 mL da amostra para as placas de Petri correspondentes, previamente identificadas;
- b) quando for necessário examinar volumes decimais inferiores a 0,1 mL da amostra, preparar as diluições da seguinte maneira:
 - homogeneizar a amostra (como em 5.3.3) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 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 transferir 10 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra;
 - proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas ($10^{-3}, 10^{-4}, \dots, 10^{-8} \dots$);
- c) homogeneizar o conteúdo do frasco com a diluição desejada (como em 5.3.3) e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 mL para cada uma das placas correspondentes;

- d) após a inoculação de todos os volumes requeridos da amostra e num espaço de tempo inferior a 20 minutos, entreabrir cada placa e acrescentar 10 a 12 mL de Agar Sabouraud Dextrose (previamente fundido e mantido em banho-maria para estabilização da temperatura a 44-46°C), tendo o cuidado de flambar a boca do tubo antes de verter o meio de cultura na placa;
- e) homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contidos na placa com movimentos circulares em forma de oito (∞), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o meio de cultura com o inóculo contra as paredes ou na tampa da placa. Deixar o meio de cultura solidificar;
- f) incubar as placas, sem invertê-las, a 20-24°C (temperatura ambiente) durante 5 a 7 dias;
- g) após o período de incubação, selecionar para a leitura as placas em duplicata, correspondentes ao volume inoculado que tenha fornecido contagem entre 30 a 300 colônias e com auxílio de um contador de colônias efetuar a contagem nessas placas (quando as placas correspondentes à todos os volumes inoculados apresentarem contagens inferiores a 30, efetuar a contagem nas placas correspondentes ao maior volume). Calcular a média aritmética das contagens e multiplicar o resultado pelo inverso da diluição utilizada nessas placas;
- h) caso seja necessário uma identificação posterior dos fungos a primeira etapa é isolá-los. Para o isolamento, selecionar colônias isoladas de diferentes tipos. Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, transferir cada uma das colônias selecionadas para um tubo contendo o meio inclinado de Agar Sabouraud Dextrose. Incubar os tubos a 20-24°C (temperatura ambiente) durante 5 a 7 dias. Conservar o tubo bem fechado, com rolha de borracha. Guardar à temperatura ambiente, evitando luz solar direta.

5.3.4.2 No caso de se adotar a técnica de "spread plate", proceder da seguinte forma:

- a) com uma pipeta esterilizada de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, coletar 1,0 mL da amostra e liberar lentamente volumes de 0,5 mL na superfície do meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, na parte central de ca

- da uma das duas placas de Petri correspondentes a esse volume. Observar que, para aplicação dessa técnica, o meio de cultura deve ter sido submetido a uma desidratação prévia após sua distribuição em placas, visando facilitar a absorção do inóculo (Anexo C);
- b) colocar a placa de Petri, já com o inóculo na superfície do meio de cultura, na placa rotatória e ligar o equipamento;
 - c) com uma alça de Drigalski devidamente flambada e esfriada, tocar levemente a superfície do meio de cultura contendo o inóculo e, com o movimento de rotação imprimido à placa de Petri pelo equipamento, obter-se o espalhamento do inóculo na superfície do meio de cultura;
 - d) a seguir, retirar a placa de Petri do equipamento, fechá-la e mantê-la na câmara de segurança biológica até a completa absorção do inóculo;
 - e) para inoculação de volumes de 0,1 mL da amostra, proceder na seqüência descrita nos itens anteriores, usando, para a inoculação da amostra na superfície do meio de cultura, pipetas esterilizadas de 0,1 mL;
 - f) quando for necessário examinar volumes decimais da amostra inferiores a 0,1 mL, preparar diluições decimais conforme descrito no item 5.3.4.1.b;
 - g) proceder da mesma forma que em 5.3.4.1.f) a 5.3.4.1.h).

Nota: O resultado das contagens obtidas na técnica de "spread plate", devem ser multiplicados por 2, quando o volume inoculado for de 0,5 mL.

5.4 Procedimento a partir de amostras sólidas ou semi-sólidas (resíduos sólidos)

5.4.1 Proceder da mesma forma que em 5.3.1 e 5.3.2;

5.4.2 A amostra antes de ser analisada é previamente selecionada, sendo retiradas pedras, gravetos, pedaços de raízes, madeira, etc., com o auxílio de uma pinça previamente flambada. Após esse processo com todos os cuidados de assepsia e com o auxílio de uma espátula esterilizada, homogeneizar a amostra. Pesar 50 g da amostra homogeneizada e com a mesma espátula, transferir a amostra para um balão contendo 450 mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 g da amostra.

5.4.3 Homogeneizar a amostra contida no erlenmeyer em agitador de aproximadamente 120-150 oscilações por minuto, durante cerca de 30 minutos.

5.4.4 Após a homogeneização da amostra, proceder conforme 5.4.4.1 ou 5.4.4.2 dependendo da técnica a ser utilizada.

5.4.4.1 Técnica de "pour plate"

Proceder da mesma forma que em 5.3.4.1.

5.4.4.2 Técnica de "spread plate"

Proceder da mesma forma que em 5.3.4.2.

Nota: Quando as amostras são de resíduos sólidos (amostras sólidas ou semi-sólidas) calcular a quantidade de água presente na amostra e expressar o resultado em gramas de peso seco.

6 RESULTADOS

6.1 Expressar o resultado em termos de unidades formadoras de colônias de fungo por mililitro (UFC/mL - amostras líquidas) ou por grama de peso seco (UFC/g - amostra sólida ou semi-sólida).

6.1.1 Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados não apresentarem colônias, expressar o resultado como < 1 multiplicando-se pelo inverso do maior volume inoculado (Exemplo: para uma amostra, cujo maior volume inoculado foi 0,01 mL e não se observou crescimento em nenhuma das placas, o resultado é expresso como < 100 UFC/mL).

6.1.2 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, relatar o resultado como > 300 , multiplicado pelo inverso do menor volume inoculado.

6.1.3 Os resultados das médias das contagens superiores a 99 devem ser arredondados, segundo as seguintes regras:

- a) quando o algarismo das unidades for igual ou maior que 5 (cinco), abandona-se o mesmo e soma-se uma unidade ao algarismo das dezenas (exemplo: 165 é expresso como 170);
- b) quando o algarismo das unidades for menor que 5 (cinco), abandona-se simplesmente o mesmo (exemplo: 142 é expresso como 140).

6.1.4 Caso as placas não puderem ser contadas devido a erro nas diluições, quebra acidental das amostras ou quando se observarem evidências de contaminação, relatar o resultado como: análise prejudicada devido a acidente de laboratório.

6.2 Do relatório deve constar no mínimo:

- a) local e datas de coleta e análise;
- b) caracterização completa da amostra;
- c) nome do coletor da amostra;
- d) resultado do ensaio, expresso conforme 6.1;
- e) código desta Norma e técnica utilizada;
- f) nome e assinatura do responsável pela análise.

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO A - IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOSA-1 Métodos de identificação

O conhecimento da morfologia é de fundamental importância na caracterização e identificação de qualquer fungo.

A identificação dos fungos é realizada através de diversos métodos de estudo sendo um dos principais a morfologia macro e microscópica. Macroscopicamente, deve-se observar as características fundamentais do fungo, como: velocidade de crescimento, tamanho da colônia, sua consistência (cremosa, coriácea, friável, etc.), aspecto (cotonoso, aveludado, pulverulento), cor, produção de pigmentos, etc.

Microscopicamente, estuda-se os órgãos sexuais ou assexuais, o micélio vegetativo (filamentoso ou leveduriforme), coloração, tamanho das células, etc. Para esta atividade é necessário contar com técnicos especializados na identificação de fungos e com vivência no campo da micologia.

Inicialmente através da morfologia macroscópica os fungos são subdivididos em: bolores e leveduras. Após essa primeira divisão são realizadas técnicas de identificação específicas para cada grupo.

A-1.1 Fungos filamentosos (bolores)Microcultivo em lâmina (Método de Riddel-Beneke)

Para o procedimento desta técnica segue-se desta forma:

- a) colocar para esterilizar em estufa regulada a 170-180°C por 30 minutos uma placa de Petri contendo no seu interior: um tubo de vidro recurvado (em forma de "U"), papel de filtro, lâmina e lamínula;
- b) fundir o meio agar batata e vertê-lo, com todos os cuidados de assepsia, em uma placa de Petri previamente esterilizada. Deixar solidificar;
- c) cortar o meio já solidificado em pequenas porções de 1 cm², com auxílio de uma espátula ou bisturi, previamente flambados, tomando todos os cuidados de assepsia;
- d) com a própria espátula ou bisturi, transferir uma das porções do meio de cultura para a placa de Petri, previamente preparada e identificada, e colocá-la sobre a superfície central da lâmina de microscopia disposta sobre o bastão de vidro;
- e) semear esporos ou pequenos fragmentos de micélio, oriundos do meio inclinado de Agar Sabouraud Dextrose incubado a 20 a 24°C (temperatura ambiente) durante \pm 7 dias, nos quatro lados da porção

- de meio de cultura;
- f) após a inoculação cobrir a porção do meio de cultura com a lamínula auxiliada por uma pinça previamente flambada;
 - g) umedecer o papel de filtro com água destilada estéril;
 - h) incubar a 20-24°C (temperatura ambiente) durante um período de \pm 7 dias (controlar através de exame microscópico a ocorrência de desenvolvimento miceliano e esporulação do fungo);
 - i) após a esporulação do fungo, remover a porção de meio de cultura existente entre a lâmina e lamínula com o auxílio de um bisturi ou estilete, previamente flambado;
 - j) na lâmina utilizada no microcultivo, adicionar uma gota do corante lactofenol "Cotton blue" e cobrir com uma lamínula limpa, evitando a formação de bolhas de ar;
 - l) enquanto que a lamínula utilizada no microcultivo deve ser colocada sobre uma lâmina limpa contendo no centro uma gota do corante lactofenol "Cotton blue", evitando também a formação de bolhas;
 - m) examinar o cultivo ao microscópio para a identificação micromorfológica do fungo.

Nota: A associação das características micro e macromorfológicas é que permite a identificação do fungo.

A-1.2 Leveduras

Para que uma levedura possa ser identificada é necessário realizar em paralelo as técnicas abaixo mencionadas:

Microcultivo em lâmina (Método de Rivalier & Seydel)

Esta técnica auxilia na identificação das leveduras através do estudo do microscópico delas.

Auxonograma

Esta prova possibilita um estudo sobre as necessidades nutricionais das leveduras.

Zimograma

Esta prova verifica a capacidade das leveduras de decompor ou não açúcares com a produção de ácidos orgânicos e CO₂.

As técnicas dessas provas e a do microcultivo em lâmina se encontram descritas na Norma CETESB L5.520. A Norma citada trata especificamente da levedura Candida albicans, mas as técnicas de identifi

cação são as mesmas utilizadas para todos os gêneros existentes de leveduras.

/ANEXO B

REVOGADA

REVOGADA

ANEXO B - MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA ISOLAMENTO E CONTAGEM DE FUNGOS EM ÁGUAS, ESGOTOS E RESÍDUOS SÓLIDOS

Alguns autores utilizam meios alternativos ao Agar Sabouraud Dextrose, para isolamento e contagem de fungos em águas, esgotos e resíduos sólidos, tais como o Agar Czapek (para Aspergillus, Penicillium e fungos relacionados), o Agar Extrato de Levedura e Malte (para leveduras) e o Agar Aureomicina - Rosa-Bengala - Neopeptona-Glicose que segundo Cooke pode ser substituído pelo Agar Rosa Bengala. Para águas poluídas e esgotos são indicados os meios Agar Aureomicina - Rosa-Bengala - Peptona-Glicose e Agar Estreptomina - Tetraciclina Extrato de Malte. Todos esses meios alternativos podem ser utilizados tanto para a técnica de "pour plate" como para a de "spread plate". São apresentadas a seguir as especificações relativas à composição e preparo desses meios de cultura.

B-1 Agar Aureomicina - Rosa-Bengala - Neopeptona-Glicose

Fórmula:

Neopeptona (ou equivalente).....	5,0	g
Glicose (dextrose).....	10,0	g
Rosa-Bengala.....	0,035	g
Agar.....	20,0	g
Solução de Clorotetraciclina (Aureomicina) ou Tetraciclina..	5,0	mL
Água destilada.....	1 000,0	mL

pH final após esterilização: $6,5 \pm 0,1$.

Preparo:

Pesar a neopeptona, a glicose, o rosa-bengala e o agar, e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterelizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estocar a temperatura ambiente fora do alcance da luz. No momento do uso, fundir o meio em banho-maria e deixar estabilizar a 55°C , após a estabilização adicionar 5 mL da solução estoque de clorotetraciclina (aureomicina) ou tetraciclina.

Solução estoque de Clorotetraciclina (Aureomicina) ou Tetraciclina

Fórmula:

Clorotetraciclina (Aureomicina) ou Tetraciclina.....	1,0	g
--	-----	---

Água destilada..... 150,0 mL

Preparo:

Para o preparo dessa solução, pesar 1,0 g do antibiótico clorotetraciclina (aureomicina) ou tetraciclina e dissolver em 150 mL de água destilada fria. Esterilizar por filtração em membrana de 0,2 μ . Es tocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, durante um período máximo de 1 semana sob refrigeração.

Nota: De preferência preparar essa solução no momento do uso.

B-2 Agar Rosa-Bengala (segundo Cooke)

Fórmula:

Peptona de soja.....	5,0	g
Dextrose.....	10,0	g
Fosfato monopotássico (KHPO) p.a.....	1,0	g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.....	0,5	g
Aureomicina.....	0,035	g
Rosa-Bengala.....	0,035	g
Agar.....	20,0	g
Água destilada.....	1 000,0	mL

pH final após esterilização: $6,0 \pm 0,1$

Preparo:

Pesar 36 g do meio desidratado "Bacto-Cooke Rosa-Bengala Agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Logo após a autoclavação, estabilizar a temperatura em banho-maria a 55°C e adicionar assepticamente 14 mL de uma solução de aureomicina (clorotetraciclina) na concentração de 2,5 mg/mL. Para obter a concentração do antibiótico dissolver 250 mg de aureomicina (clorotetraciclina) em 100 mL de água destilada estéril.

B-3 Agar Glicose Extrato de Levedura e Malte

Fórmula:

Extrato de levedura.....	3,0	g
Extrato de malte.....	3,0	g

Neopeptona (ou equivalente).....	5,0 g
Dextrose.....	10,0 g
Agar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Não é necessário ajustar o pH.

Preparo:

Pesar todos os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

B-4 Agar CzapekFórmula:

Sacaroše.....	30,0 g
Nitrato de sódio (NaNO ₃) p.a.....	3,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	1,0 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) p.a.....	0,5 g
Cloreto de potássio (KCl) p.a.....	0,5 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄) p.a.....	0,01 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH após esterilização: 7,3 ± 0,1

Preparo:

Pesar todos os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

B-5 Agar Neopeptona-Glicose (Emmons' Sabouraud Agar ou Emmons' Sabouraud Dextrose Agar)Fórmula:

Neopeptona (ou equivalente).....	5,0 g
Dextrose.....	10,0 g
Agar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final após esterilização: 6,5 ± 0,1.

Preparo:

Pesar a neopeptona, a glicose e o agar e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

B-6 Agar Aureomicina - Rosa-Bengala - Peptona-GlicoseFórmula:

Dextrose.....	10,0	g
Peptona.....	5,0	g
Fosfato de potássio dibásico (KH ₂ PO ₄).....	1,0	g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0,5	g
Solução de cloreto de aureomicina.....	200,0	mL
Rosa-Bengala.....	0,035	g
Agar.....	20,0	g
Água destilada.....	800,0	mL

Preparo:

Pesar todos os ingredientes, exceto a solução de cloreto de aureomicina, e acrescentar 800 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter o meio preparado em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura e adicionar 200 mL da solução de cloreto de aureomicina.

Solução de cloreto de aureomicinaFórmula:

Cloreto de aureomicina.....	70,0	mg
Água destilada.....	200,0	mL
pH final: 5,4.		

Preparo:

Para o preparo dessa solução pesar 70,0 mg de cloreto de aureomicina e dissolver em 200 mL de água destilada fria. Esterilizar por filtração e estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, durante um período máximo de 1 semana sob refrigeração.

Nota: De preferência preparar essa solução no momento do uso.

B-7 Agar Estreptomicina-Tetramicina - Extrato de Malte

Fórmula:

Extrato de malte.....	30,0 g
Peptona.....	5,0 g
Solução de estreptomicina.....	100,0 mL
Solução de tetramicina.....	100,0 mL
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	800,0 mL
pH final após esterilização: $5,4 \pm 0,1$	

Preparo:

Pesar todos os ingredientes, exceto a estreptomicina e a tetramicina, e acrescentar 800 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter o meio preparado em banho-maria a 55°C , para estabilização da temperatura e adicionar assepticamente 100 mL de cada solução de antibióticos.

Solução de estreptomicina

Fórmula:

Estreptomicina.....	70,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Para o preparo dessa solução, pesar 70,0 g do antibiótico estreptomicina e dissolver em 100 mL de água destilada fria. Esterilizar por filtração em membrana de $0,2 \mu$. Estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, durante um período máximo de 1 semana sob refrigeração.

Nota: De preferência preparar essa solução no momento do uso.

Solução de tetramicina

Fórmula:

Tetramicina.....	70,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Para o preparo dessa solução, pesar 70,0 g do antibiótico tetramicina e dissolver em 100 mL de água destilada fria. Esterilizar por filtração em membrana de 0,2 μ . Estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, durante um período máximo de 1 semana sob refrigeração.

/ANEXO C

REVOGADA

ANEXO C - PRÉ-SECAGEM DO MEIO DE CULTURA A SER UTILIZADO NA TÉCNICA DE "SPREAD PLATE"

Após a distribuição do meio de cultura em placas de Petri (item 4.4.1.a.), o mesmo deve ser submetido a uma pré-secagem para ser obtida uma perda de 2 a 3 g de água. Essa pré-secagem tem como finalidade facilitar a absorção do inóculo da amostra, quando da realização da análise. A desidratação do meio de cultura pode ser obtida através de sua incubação a uma determinada temperatura e durante um determinado período de tempo e os dados abaixo sumarizam a relação entre perda de água e temperaturas e tempos de incubação.

TABELA 1 - Efeito da temperatura de secagem na perda de peso de placas com 15 mL de meio de cultura, estocadas separadamente

Temperatura (°C)	Tempo requerido para perda de peso (em g)							
	Placas em posição invertida							
	com tampa				sem tampa			
	1g	2g	3g	4g	1g	2g	3g	4g
24	32	64	95	125	3,7	7,0	10,5	14,0
37	17	35	51	67	1,7	3,5	5,3	7,0
50	6	12	18	24	0,7	1,3	1,9	2,7
60	4	8	12	16	-	-	-	-

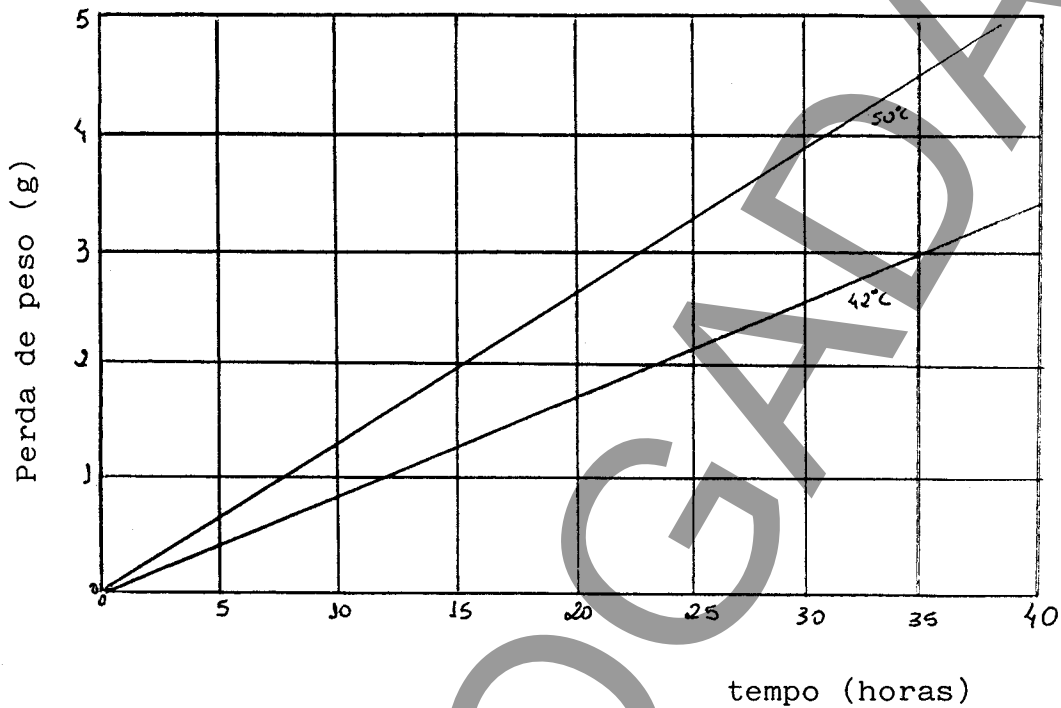
Fonte: Dutka, B.J. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada Centre for Inland Waters, Burlington, Ontario, 1978.

Essa pré-secagem pode também ser feita através de exposição das placas abertas ao fluxo de ar em câmaras de segurança biológica.

O gráfico abaixo sumariza os resultados obtidos pelo Alberta Environmental Centre-Vegreville, Canada em um estudo efetuado nesse sentido (dados não publicados), com as placas colocadas em diferentes posições dentro da câmara de fluxo laminar.

/FIGURAS 1 E 2

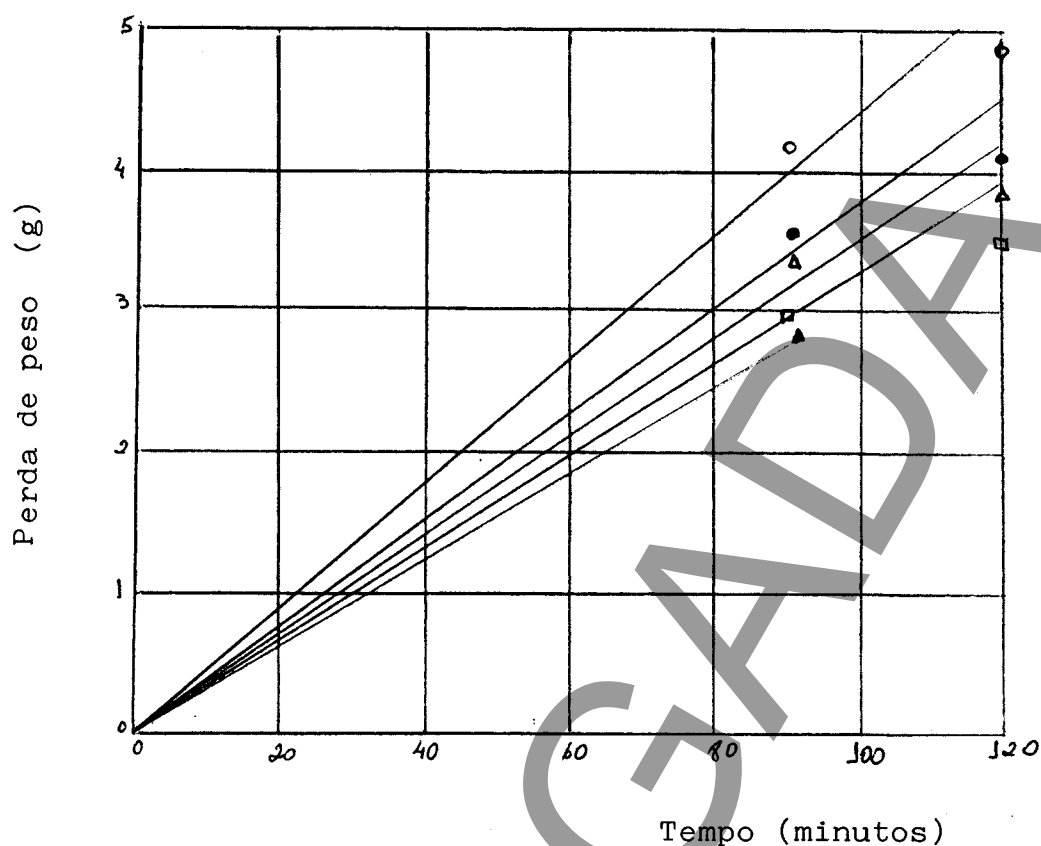
REVOGADA



Fonte: Water Purification Lab., Chicago Dep. Water (dados não publicados).

FIGURA 1 - Efeito da temperatura de secagem na perda de peso de placas com 15 mL de meio de cultura, estocadas separadamente, sem tampa e em posição invertida

/FIGURA 2



Legenda:

- distribuição no fundo da câmara, placas sem tampa
- distribuição no fundo da câmara, placas parcialmente tampadas
- △ distribuição próxima à borda da câmara, placas sem tampa
- distribuição próxima à borda da câmara, placas parcialmente tampadas
- ▲ distribuição ao acaso, placas sem tampa

FIGURA 2 - Secagem do meio de cultura (25 mL) em placas em câmara de segurança biológica (temperatura ambiente 24-26°C, umidade relativa 30 a 33%, velocidade do ar 0,6 m/s) - Efeito da posição das placas

ANEXO D - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALD-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

D-2 Controle da eficiência da autoclave

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

D-3 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, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar a sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de ensaios específicos. Ver Norma CETESB L5.215.

D-4 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meio 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 conveniente ao redor da tampa de rosca, que retardará a decomposição do meio.

D-5 Cuidados no preparo dos meios de cultura

D-5.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quando à cor, odor, consistência e, principalmente, não se apresentarem endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes, para que não liberem substâncias, tais como cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

D-5.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água destilada fria, principalmente para os meios que contêm agar, pois, se for utilizada água quente, forma-se imediatamente em torno de cada partícula de agar uma película que protege o núcleo. Com a elevação da temperatura, ocorre um aquecimento seco do núcleo, que impede que a partícula se umedeça totalmente. Por esse motivo, aconselha-se deixar os meios que contenham agar de molho durante 15 minutos em água destilada fria, agitando-se a mistura freqüentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

D-6 Controle de qualidade dos meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle de qualidade dos meios de cultura a serem empregados no teste para determinação de isolamento e contagem de fungos. Ver Norma CETESB, L5.216.

D-7 Precauções

D-7.1 Ao fundir o meio de cultura a ser usado na técnica de "pour plate" (Agar Sabouraud Dextrose), evitar:

- a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o meio de cultura, pois essa, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;
- b) exposição prolongada e temperaturas elevadas durante e após a fusão;
- c) fundir quantidade do meio superior à que será usada num período de 3 horas, para evitar formação de partículas de fosfato insolúvel, que poderão ser confundidas com colônias de bactérias, durante a contagem de placas.

D-7.2 Durante a estabilização da temperatura dos meios de cultura a serem usados na técnica de "pour plate", evitar que a temperatura do banho-maria exceda 46°C, pois alguns fungos mais sensíveis poderão ser mortos, quando se adiciona o meio sobre o inóculo da amostra.

D-7.3 Na técnica de "spread plate", tocar delicadamente a superfície do meio de cultura com a alça de Drigalski, tomando cuidado para não feri-lo.

ANEXO E - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- E-1 ALEXOPOULOS, C.J. Introductory Mycology, 2 ed., New York, John Wiley & Sons, 1962.
- E-2 ATLAS, R.M; BARTHA, R. Microbial ecology - Fundamentals and applications. 2 ed., California, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987, p. 41-48.
- E-3 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, Microbiological Examination of Water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed., Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985, p. 981-992.
- E-4 CETESB - Guia de coleta e preservação de amostras de águas. São Paulo, 1ª ed., 1988, 150 p.
- E-5 _____. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978 (Norma Técnica L5.010).
- E-6 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (Norma Técnica L5.216).
- E-7 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1978 (Norma Técnica M1.001).
- E-8 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1978 (Norma Técnica L5.215).
- E-9 _____. Candida albicans - Determinação pela técnica de membrana filtrante, São Paulo, 1986, (Norma Técnica L5.520)
- E-10 COONEY, D.G. & EMERSON, R. Thermophilic Fungi. São Francisco and London, W.H. Freeman and Company, 1964.
- E-11 COOKE, W.B. A laboratory guide to fungi in polluted waters, sewage and sewage treatment systems. Their identification and culture. Cincinnati-Ohio, Environmental Health Series,

Division of Water Supply and Pollution Control, 1963,132p.

- E-12 COOKE; W.B. The role of fungi in waste treatment. CRC Critical Rev.Eviron.Control., 1: 581, 1971.
- E-13 _____. Are fungi important in sewage treatment? Public Works 90: 113-114, 1959.
- E-14 DAVIS, D.B. DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, S.H. Microbiology, 3 ed. Harper International Edition, 1980, p. 817-850.
- E-15 DIFCO Dehydrated cultura media: guide for selection of cultura media. In: Difco manual of dehydrated culture media and clinical laboratories procedures. 9 ed. Michigan, Difco Laboratories, 1953.
- E-16 DUTKA, B.J. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Burlington-Ontario, Canada Centre for Inland Waters, 1976.
- E-17 EPA Training Manual. Current practices in water microbiology s.l. p.Cincinnati-Ohio, Environmental Protection Agency, 1973.
- E-18 LODDER, J. The yeasts - A taxonomic study. 2 ed., Amsterdam, 1970.
- E-19 Mc.GINNIS, M.R. Laboratory handbook of medical mycology. North Carolina, 1980.
- E-20 MINAMI, P.S. Técnicas micológicas - roteiro de aulas práticas. São Paulo, EDUSP, 1981, 96 p.
- E-21 PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, Mc Graw-Hill do Brasil, 1981, 1 v., p. 315-341.
- E-22 PORTO, E. & LACAZ, C.S. Guia de Micologia Médica. Apresentado no: Curso Interncional de Micologia. São Paulo, EDUSP, 1984.
- E-23 RHEINHEIMER, G. Aquatic microbiology. 2 ed., New York, John Wiley & Sons, 1980, 235 p.

- E-24 SILVEIRA, V.D. Micologia, 4 ed., Rio de Janeiro, Interamericana, 1981, 332 p.
- E-25 SIMARD, R.E. Yeasts as an indicator of pollution. Marine Poll Bull, 12: 123-125, 1971.
- E-26 STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A. Mundo dos Microbios. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda., 1969, p.104-128.
- E-27 WAKSMAN, S.A. Soil microbiology, London, John Wiley & Sons, 1952.
-

REVOGADO