



NORMA TÉCNICA

L5.011

Fev/1979
13 PÁGINAS

Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem de material de laboratório: 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](http://www.cetesb.sp.gov.br)

<u>Sumário</u>	<u>Página</u>
Introdução	1
1 Objetivo	2
2 Definições	2
3 Aparelhagem	2
4 Execução do Ensaio	6
5 Interpretação dos Resultados	9
Anexo A	11
Anexo B	15

INTRODUÇÃO

É de fundamental importância que em Laboratórios de Microbiologia os materiais e vidrarias utilizados para as análises estejam livres de substâncias tóxicas ou nutrientes, derivadas de sabões e detergentes, cujos resíduos podem atuar sobre os microrganismos pesquisados e desta forma, interferir nos resultados dos exames.

Os detergentes são formulações comerciais, compostas de agentes tenso-ativos e outros aditivos utilizados para lavagem ou limpeza.

O principal componente de um detergente, que lhe dá a propriedade de "limpar", é chamado surfactante ou princípio ativo dos detergentes. De acordo com o tipo de surfactante, os detergentes sintéticos são divididos em aniônicos, catiônicos e não iônicos, sendo que, os aniônicos apresentam carga negativa e os catiônicos carga positiva quando dissociados em água; os não iônicos apresentam grupos hidrofílicos não ionizáveis.

Os detergentes catiônicos agem sobre a maioria dos microrganismos, enquanto que os não iônicos não são especialmente inibidores e até mesmo chegam a ser bons nutrientes; os aniônicos possuem ação bactericida moderada.

A ação destes detergentes sobre um microrganismo pode levar à inibição do crescimento ou produzir sua morte. Além disso, os efeitos tóxicos dos detergentes são atribuíveis a sua ação química sobre as estruturas celulares, especialmente a membrana celular e, sendo ela a responsável pela preservação da integridade da célula, impedindo o extravasamento dos constituintes para o meio externo, a ruptura desta estrutura faz com que alguns componentes celulares, tais como, aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas e íons orgânicos, escoem para fora, com consequente morte dos microrganismos.

Portanto, os detergentes a serem utilizados na lavagem dos materiais e vidrarias deverão ser previamente testados, devendo-se estabelecer critérios rígidos relativos à escolha dos detergentes e cuidados especiais no processo de lavagem, a fim de que resíduos alcalinos ou ácidos, não permaneçam nos materiais, pois poderão alterar os constituintes das soluções e meios de cultura, desta forma, prejudicando a confiabilidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os testes utilizados para verificar a toxicidade de detergentes usados para lavagem dos vários tipos de vidraria e materiais utilizados em laboratório de microbiologia.

2 DEFINIÇÕES

2.1 *Enterobacter aerogenes*: são bacilos curtos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-negativos, imóveis ou móveis por flagelos peritríquios. Fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 horas, a 35°C.

2.2 p.a.: para análise.

2.3 q.s.p.: quantidade suficiente para.

3 APARELHAGEM

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Equipamentos de esterilização

3.1.1.1 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 em calor seco e ter capacidade para permitir a circulação de 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 - 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de duas horas, a 170 - 180°C.

3.1.1.2 Autoclave: deve ser de tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e equipada com uma válvula de segurança e com um termômetro, cujo bulbo deve estar na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). Operar-se-á a autoclave de modo a substituir por vapor todo ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave durará, no máximo, uma hora, devendo-se acompanhar os ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C dentro de, no máximo, 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

3.1.2 Incubadora bacteriológica

Equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Deve 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, serão colocados um ou mais termômetros em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deve manter 75 a 85% de umidade relativa. A incubadora deverá ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 18 a 30°C.

3.1.3 Balança

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

3.1.4 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 proceder à agitação.

3.1.5 Pipetas

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

3.1.6 Caixas de aço inoxidável

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

3.1.7 Bico de Bunsen ou similar.

3.1.8 Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, de 18 mm X 180 mm, 16 mm X 150 mm e de 15 mm X 150 mm com tampa de rosca.

3.1.9 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 a serem contadas.

3.1.10 Placas de Petri

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

3.1.11 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com exatidão de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos 2 vezes ao dia, com tampões de pH = 4,0, pH = 6,86 e pH = 9,18.

3.1.12 Banho-maria

Equipado com um termostato para temperatura de aproximadamente 44 - 46°C. Para verificar a temperatura, deve ser colocado um termômetro e registros periódicos devem ser efetuados.

3.1.13 Bandejas de plástico ou aço inoxidável

3.1.14 Equipamentos para preparação de meios de cultura e soluções

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

3.1.15 Agulha de inoculação

Fio de platina ou níquel-cromo, com 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro; são colocadas em cabo de metal (cabo de Kolle).

3.1.16 Destilador de água, aparelho de deionização ou sistema purificador de água.

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

3.1.17 Porta pipetas de aço inoxidável.3.1.18 Estantes

De arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio.

3.2 Reagentes

Para o preparo dos meios de cultura, dá-se preferência à utilização de meios de cultura desidratados de procedência idônea, visando maior uniformidade dos meses. Pode-se, no entanto, prepará-los no laboratório, sendo que os reagentes a serem utilizados devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos e de outros carboidratos fermentáveis que não os em teste e fornecer os nutrientes necessários para os organismos pesquisados.

3.2.1 Reagentes necessários:

- a) agar;
- b) dextrose;
- c) extrato de carne;
- d) extrato de levedura;
- e) fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.;
- f) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- g) peptona;
- h) sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- i) triptona.

3.2.2 Meios de cultura desidratados:

- a) Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura ("Plate Count Agar");
- b) Caldo Nutriente ("Nutrient Broth");
- c) Agar Nutriente ("Nutrient Agar").

3.2.3 Cultura pura de *Enterobacter aerogenes* IMVIC (---+)3.3 Meios de cultura3.3.1 Agar Triptona Glicose Extrato de LeveduraFórmula:

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Agar	15,0 g

Água destilada 1.000 ml
 pH final após esterilização: $7,0 \pm 0,1$.

Preparo

Pesar 23,5 g do meio desidratado "Plate Count Agar" e acrescentar 1.000 ml de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,0 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 12 a 15 ml em tubos de 16 mm X 150 mm com tampa de rosca ou volumes de 150 ml em frascos Erlenmeyer de 250 ml. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

3.3.2 Caldo Nutriente

Fórmula:

Extrato de carne 3 g
 Peptona 5 g
 Água destilada 1.000 ml
 pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,1$.

Preparo

Pesar 8,0 g do meio desidratado "Nutrient Broth" e acrescentar 1.000 ml de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 20 ml nos tubos de ensaios correspondentes. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

3.3.3 Agar nutriente

Fórmula:

Peptona 5,0 g
 Extrato de carne 3,0 g
 Agar 15,0 g
 Água destilada 1.000 ml
 pH final após esterilização: 6,8.

Preparo:

Pesar 23 gramas do meio desidratado "Nutrient Agar" e acrescentar 1.000 ml de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 ml em tubos de ensaio de 16 mm X 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após autoclavação e enquanto o meio ainda estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada, até que o meio se solidifique, visando obter uma superfície inclinada com 6 a 7 cm de comprimento.

3.4 Soluções

3.4.1 Água de diluição

3.4.1.1 Solução estoque A

Fórmula:

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a. 34,0 g
 Água destilada 1.000 ml

Preparo

Dissolver o fosfato monopotássico em 500 ml de água destilada, ajustar o pH para 7,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N) e completar o volume para um litro com água destilada.

3.4.1.2 Solução estoque B

Fórmula:

Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a. 50,0 g
Água destilada 1.000 ml

Preparo

Dissolver o sulfato de magnésio em um litro de água destilada.

3.4.1.3 Preparo da água de diluição

Adicionar 1,25 ml da solução estoque A e 5 ml da solução estoque B a um balão volumétrico e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir em quantidades que assegurem, após autoclavação durante 15 minutos, a 121°C, volumes de 90 e 99 \pm 2 ml.

4 EXECUÇÃO DO ENSAIO

4.1 Princípio do método

Baseando-se no princípio de que resíduos ácidos ou alcalinos, tóxicos ou nutritivos, liberados por agentes químicos, podem exercer uma ação inibitória ou estimulante sobre o crescimento dos microrganismos, este teste permite verificar a toxicidade do detergente usado no laboratório de microbiologia, através da análise dos resultados relativos à contagem em agar padrão correspondente a uma densidade conhecida de bactérias inoculadas nos materiais em teste, submetidos a diferentes ciclos de lavagem, em relação aos resultados obtidos em um grupo controle.

4.2 Procedimento

4.2.1 No dia anterior à execução do teste, preparar uma suspensão bacteriana da forma descrita nos itens 4.2.1.1 a 4.2.1.9.

4.2.1.1 Com o auxílio de uma agulha de inoculação previamente esterilizada e resfriada, transferir um inóculo da cepa de *Enterobacter aerogenes* (IMViC^{- - + +}), para um tubo de ensaio de 16 mm X 150 mm, contendo agar nutriente com uma parte inclinada de 6 a 7 cm de comprimento. Semear levemente a cultura sobre a superfície do agar inclinado, de modo a obter uma película uniforme de crescimento.

4.2.1.2 Incubar a 35 \pm 0,5°C durante 24 \pm 2 horas.

4.2.1.3 Após o período de incubação, pipetar 1 a 2 ml de água de diluição estéril (de um frasco contendo 99 ml) e colocar sobre a cultura no agar inclinado.

4.2.1.4 Com a mesma pipeta, homogeneizar a cultura, tomando cuidado para que o agar não seja danificado.

4.2.1.5 Ainda com a mesma pipeta, transferir toda a suspensão para o frasco de água de diluição original.

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

4.2.1.7 Com uma pipeta estéril de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da suspensão do frasco original para um segundo frasco, antecipadamente identificado, contendo 99 ml de água de diluição com tampão fosfato. Prepara-se assim uma diluição decimal 1/100 da suspensão bacteriana. (10^{-2}).

4.2.1.8 Proceder desta maneira nas seqüências de diluições desejadas (10^{-4} a 10^{-6}).

4.2.1.9 Com uma pipeta estéril de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da diluição 10^{-6} , para um frasco antecipadamente identificado, contendo 30 ml de água de diluição com tampão fosfato. Prepara-se assim a última diluição (1:1.000.000) a partir da qual devem ser obtidas contagens de 20 a 60 células viáveis de *Enterobacter aerogenes* por ml.

OBSERVAÇÃO:

Devido à variação entre cepas do mesmo microrganismo, meios de cultura e superfícies do agar, é necessário se fazer usualmente um ajuste no processo de diluição a fim de se obter a densidade específica de 20 a 60 células viáveis por ml. Para estabelecer numericamente uma variação entre o crescimento em um meio e o microrganismo específico, fazer uma série de contagens em placas de Petri a partir da diluição 10^{-6} , determinando-se, deste modo, a densidade bacteriana. Se o procedimento estiver bem padronizado (como por exemplo, a área superficial do agar inclinado, técnicas de laboratório, etc.) é possível se reproduzir os resultados com a mesma cepa de bactéria.

4.2.2 Preparar as placas de Petri e os tubos de ensaio para o teste, da forma descrita nos itens 4.2.2.1 a 4.2.2.5.

4.2.2.1 Lavar e enxaguar 6 placas de Petri ou 6 tubos de ensaio de 18 mm X 180 mm de maneira habitual e identificar o conjunto como grupo A.

4.2.2.2 Lavar um outro grupo de 6 placas de Petri ou 6 tubos de ensaio de 18 mm X 180 mm de maneira habitual e enxaguá-los com água destilada 12 vezes consecutivas; identificar o conjunto como grupo B.

4.2.2.3 Lavar um terceiro grupo de 6 placas de Petri ou 6 tubos de ensaio de 18 mm X 180 mm com o detergente em teste e, deixar secar sem enxaguar; identificar o conjunto como grupo C.

4.2.2.4 Esterilizar os tubos de ensaio e as placas de Petri correspondentes dos grupos A, B e C em estufa, a $170 - 180^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas.

4.2.2.5 Para os tubos de ensaio dos grupos A, B e C, proceder da seguinte maneira:

- distribuir em cada um dos tubos de ensaio dos grupos A, B e C, 20 ml de Caldo Nutriente. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

4.2.3 Na seqüência do teste para o qual estão sendo utilizadas as placas de Petri, proceder da forma descrita nos itens 4.2.3.1 a 4.2.3.7.

4.2.3.1 Identificar as placas de Petri correspondentes a cada grupo, anotando, na tampa, a data e o grupo a que pertence (A, B ou C).

4.2.3.2 Homogeneizar, no mínimo 25 vezes a última diluição preparada a partir da suspensão bacteriana contendo 20 a 60 células viáveis por ml (4.2.1.9), inclinndo o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço.

4.2.3.3 Com uma pipeta estéril de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da diluição especificada no item anterior para cada uma das placas de Petri correspondentes aos grupos A, B e C.

4.2.3.4 Após a inoculação de todas as placas e num espaço de tempo inferior a 20 minutos, entreabrir cada placa e acrescentar 12 a 15 ml de Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a $44 - 46^{\circ}\text{C}$, tendo o cuidado de flambar a boca do tubo antes de se verter o agar na placa.

4.2.3.5 Homogeneizar o inóculo e o agar contidos na placa com movimentos circulares em forma de oito (∞), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o agar com o inóculo contra as paredes ou tampa da placa.

4.2.3.6 Após a solidificação do agar, incubar as placas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas, em posição invertida para evitar a condensação de água sobre a superfície do agar.

4.2.3.7 Após o período de incubação, efetuar a leitura das placas correspondentes a cada grupo (A, B e C), com auxílio de um contador de colônias Quebec ou similar e calcular a média das contagens obtidas para cada grupo.

4.2.4 Na sequência do teste para o qual estão sendo utilizados tubos de ensaio, proceder da forma descrita em 4.2.4.1 a 4.2.4.10.

4.2.4.1 Identificar os tubos de ensaio contendo o Caldo Nutriente, anotando a data e o grupo a que pertence (A, B ou C).

4.2.4.2 Homogeneizar no mínimo 25 vezes; a última diluição preparada a partir da suspensão bacteriana, contendo 20 a 60 células viáveis por ml (4.2.1.9), inclinndo o frasco formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço.

4.2.4.3 Com uma pipeta estéril de 1ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da diluição especificada no item anterior para cada um dos tubos de ensaio correspondentes aos grupos A, B e C.

4.2.4.4 Após a inoculação, incubar todos os tubos com o Caldo Nutriente a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

4.2.4.5 Após período de incubação, efetuar diluições decimais 10^{-4} a 10^{-7} a partir das culturas nos tubos de ensaio. Para isto, proceder da seguinte maneira:

- a) com uma pipeta estéril de 10 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 ml das culturas contidas nos tubos de ensaio para frascos antecipadamente identificados, contendo 90 ± 2 ml de água de diluição com tampão fosfato. Prepara-se, assim, a primeira diluição decimal da amostra (10^{-1}), sendo que 1 ml da mesma corresponde ao volume de 0,1 ml da amostra;
- b) homogeneizar os frascos com o conteúdo da primeira diluição efetuada, no mínimo 25 vezes, inclinndo o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço;
- c) com uma pipeta estéril de 10 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia,

sia, transferir 10 ml da diluição feita anteriormente (10^{-1}) para frascos antecipadamente identificados, contendo 90 ± 2 ml de água de diluição com tampão fosfato, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 ml da mesma corresponde a 0,01 ml da amostra;

d) proceder desta maneira, na sequência de diluições necessárias para o teste 10^{-4} a 10^{-7} .

4.2.4.6 Identificar placas de Petri, em duplicata para a inoculação correspondente a cada uma das diluições de 10^{-4} a 10^{-7} , anotando na tampa, a diluição e o grupo ao qual correspondem (A, B ou C).

4.2.4.7 Homogeneizar o conteúdo dos frascos contendo a primeira diluição a ser utilizada 10^{-4} , como em 4.2.4.5b).

4.2.4.8 Com uma pipeta estéril de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 ml da diluição 10^{-4} para cada placa de Petri em duplicata correspondente aos grupos A, B e C, previamente identificadas.

4.2.4.9 Proceder como em 4.2.4.8 para a inoculação das diluições necessárias para o teste 10^{-5} a 10^{-7} .

4.2.4.10 Proceder novamente conforme descrito em 4.2.3.4, 4.2.3.5, 4.2.3.6 e 4.2.3.7.

5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As conclusões relativas ao teste para verificação da toxicidade do detergente, realizado a partir de placas de Petri ou tubos de ensaio, são as descritas nos itens 5.1 e 5.2.

5.1 Se a média das contagens de colônias de bactérias correspondentes ao grupo C, for inferior a 15% ou mais, em relação à média do grupo B, significa que o detergente utilizado contém substâncias bactericidas ou bacteriostáticas e, portanto, um outro detergente deve ser selecionado.

5.2 Se a média das contagens de colônias de bactérias correspondentes ao grupo A, foi inferior a 15% ou mais, em relação à média do grupo B, significa a presença de resíduos tóxicos de detergentes nos materiais de vidro procedentes do processo de lavagem, portanto, o detergente utilizado deve ser substituído por um outro não tóxico e, cuidados especiais relativos à lavagem devem ser estabelecidos.

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAIS

A-1 Cuidados especiais com a vidraria

Ver Norma CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

A-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 a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24 - 48 horas.

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.

A-3 Armazenamento da solução-estoque de água de diluição

A solução-estoque de água de diluição deve ser armazenada em geladeira, distribuída em frascos cujos volumes sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Antes de ser utilizada, deve-se verificar se não houve qualquer alteração em relação à cor ou presença de material em suspensão, pois, neste caso, deverá ser descartada.

A-4 Armazenamento da água destilada

A água destilada ou deionizada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapores que possam ser produzidos no laboratório.

A-5 Armazenamento de meios de cultura desidratados

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

A-6 Cuidados no preparo dos meios de cultura

A-6.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quanto à cor, odor, consistência e, principalmente, não se apresentarem endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes para que não liberem elementos tóxicos tais como: cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

A-6.2 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 frequentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

A-7 Controle de qualidade dos meios de cultura

A-7.1 Todos os reagentes usados na preparação dos meios de cultura devem ser de grau bacteriológico. Isto é particularmente importante, pois certas impurezas químicas encontradas em reagentes de grau inferior ou comercial podem estar presentes em concentrações suficientes para suprimir ou inibir o crescimento bacteriano, ou possibilitar a ocorrência de reações inespecíficas.

A-7.2 Antes e após a esterilização, deve-se verificar o pH de cada partida de meio de cultura preparado, anotando-se seu valor, a data e o nº de controle do lote. Esta verificação é fundamental, pois há possibilidade de ocorrência de erros nas pesagens, aquecimento excessivo, contaminação química ou deterioração de ingredientes durante o armazenamento e após a abertura dos frascos.

A-7.3 Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções e meios de cultura devem ser rotineiramente testados quanto à presença de bactérias ou fungos contaminantes ou quanto a qualquer alteração porventura ocorrida com os corantes indicadores. Os meios de cultura devem ainda ser testados quanto à eficiência no isolamento de bactérias em teste e na especificidade em relação às reações bioquímicas.

A-7.4 Ensaio de controle para o teste de contagem de bactérias em placas.

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

A-8 Precauções

A-8.1 Ao fundir o Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura, evitar:

- a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o agar, pois esta, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;
- b) exposição prolongada à 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 em placas.

A-8.2 Durante a estabilização do Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura, evitar que a temperatura do banho-maria exceda 46°C , pois algumas bactérias mais sensíveis poderão ser mortas, quando se adiciona o meio sobre o inóculo.

A-9 Local de trabalho

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

A-9.1 Câmara asséptica

As câmaras assépticas devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e

ser livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. Conversa desnecessária deve ser evitada.

A-9.1.1 Limpeza da câmara: é feita após o expediente diário, sem varreções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim da semana, realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol puro, que é colocado em placas de Petri, para evaporar.

A-9.1.2 Lâmpadas germicidas (U.V.): podem ser ligadas nos intervalos de trabalho e assim permanecer durante a noite. Convém lembrar que estas lâmpadas têm tempo de vida relativamente curto (cerca de 6000 horas para lâmpadas de 30 Watts), que sua eficiência depende da distância existente entre elas e a área a ser esterilizada, que apresentam ação superficial apenas, e que poeira acumulada em sua superfície diminui seu poder germicida. Deve-se tomar medidas de proteção apropriadas para que não aconteça a exposição do operador às radiações ultravioleta.

A-9.1.3 Calor: o aquecimento excessivo da câmara asséptica deve ser controlado pelo ajuste da altura da chama do bico de Bunsen através de seu dispositivo regulador ou pelo uso de uma pinça de Mohr. Se a câmara tiver ar condicionado, que a entrada desse ar não se dê diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha filtro de ar especial.

A-9.2 Capela de fluxo laminar

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

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Standard methods for the examination of water and wastewater, 14 ed. APWA, AWWA, WPC, New York - NY., 1975.

B-2 CETESB - Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de análises de água. São Paulo, 1978.

B-3 DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, W.B. - Microbiologia - Fisiologia Bacteriana. Edart - São Paulo, Livraria Editora Ltda., 1 : 1.973.

B-4 DEHYDRATED culture media: guide for selection of culture media. In: Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9 ed, Michigan, Difco Laboratories, 26: 1.953.

B-5 GELDREICH, E.E. - Handbook for evaluating water bacteriological laboratories; 2 ed., Ohio, Municipal Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Environmental Protection Agency, 1975.

B-6 LAMANNA, C.; MALLETTE, M.F.; ZIMMERMAN, L.M. - Basic Bacteriology, 4 ed. , Baltimore, Williams and Wilking Company, 1973.

B-7 McKINNEY, R.E. - Microbiology for sanitary engineers. New York, San Francisco, Toronto, London. McGraw Hill Book Company, Inc., 1.962.

B-8 McKINNEY, R.E. - Detergents: Composition, characteristics of components , uses and applications. Presented in the Seminar on "Considerations for a detergent policy". State of São Paulo, CETESB- São Paulo, Brasil, 1.976.

B-9 SALLE, A.J. - Fundamental principles of bacteriology, 5 ed., New York , Toronto, London. McGraw-Hill Book Company, Inc. Tokio, Kōgakucha Company, Ltd. , 1.961.