



# NORMA TÉCNICA

L5.201

Jan/2006  
14 PÁGINAS

Contagem de bactérias heterotróficas : 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)

	<b>CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS</b>	<b>L5.201</b>
	<b>MÉTODO DE ENSAIO</b>	<b>Jan/06</b>

## Sumário

### Página

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Objetivos</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Documentos Complementares</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Definições</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Aparelhagem</b> .....	<b>3</b>
<b>5. Meios de Cultura e Soluções</b> .....	<b>6</b>
<b>6. Execução do Ensaio</b> .....	<b>7</b>
<b>7. Resultados</b> .....	<b>9</b>
<b>8. Meios de Cultura Alternativos para Determinação da Densidade de Bactérias Heterotróficas em Água</b> .....	<b>12</b>
<b>9. Referências</b> .....	<b>14</b>

## Introdução

As bactérias heterotróficas são aquelas que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, estando incluídas neste grupo tanto bactérias patogênicas como aquelas pertencentes ao grupo dos coliformes. Entretanto, de acordo com estudos epidemiológicos, foi concluído que, na ausência de contaminação fecal, não há uma associação direta entre as concentrações de bactérias heterotróficas na água de consumo humano e efeitos à saúde na população geral (BARTRAM, 2003).

As bactérias heterotróficas estão presentes em todos os tipos de água, nos alimentos, no solo, na vegetação e no ar. Sua contagem pode fornecer uma indicação geral sobre a qualidade microbiológica da água tratada, e quando realizada regularmente pode demonstrar alterações devido ao armazenamento (recrescimento, formação de biofilme), eficiência dos métodos de tratamento, integridade e limpeza do sistema de distribuição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Além disso, muitas bactérias heterotróficas apresentam a capacidade de multiplicar-se na rede de abastecimento por meio da utilização de nutrientes presentes nos materiais empregados em sua construção e, também, de carbono orgânico assimilável ou particulado naturalmente presente nas águas. Assim, a realização dessas análises pode indicar se determinados materiais não são adequados ou se estão ocorrendo alterações na qualidade da água captada (STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2002).

Um aspecto extremamente importante é a influência inibidora dessas bactérias na detecção dos coliformes. De acordo com estudos realizados, contagens elevadas de bactérias heterotróficas podem diminuir a frequência de detecção de coliformes, quando são empregados os métodos baseados na fermentação da lactose. Essa inibição é mais acentuada para a técnica de membrana filtrante do que para a técnica de tubos múltiplos, tendo sido observada por alguns pesquisadores já com densidades de bactérias heterotróficas de 500UFC/mL, enquanto que em outros estudos essa interferência foi verificada somente quando as concentrações dessas bactérias eram iguais ou superiores a 1000UFC/mL. Essa inibição não ocorre para os métodos que utilizam a técnica do substrato definido (ALLEN, 2002).

Segundo a legislação brasileira vigente para água de consumo humano, as bactérias heterotróficas não são utilizadas como critério de qualidade, mas sua concentração deve ser determinada em 20% das amostras analisadas quanto à presença de coliformes e seu valor não deve ultrapassar 500 UFC/mL (BRASIL, 2004). Quanto à água mineral natural e à água natural, a legislação estabelece que a contagem de bactérias heterotróficas seja realizada diariamente na fonte ou poço (BRASIL, 2000).

A diversidade e concentração de bactérias heterotróficas, determinada por meio de um método de análise, irá depender das variáveis desse método, que incluem a composição do meio, o tempo e a temperatura de incubação e a técnica de inoculação. Apenas uma pequena proporção dos microrganismos metabolicamente ativos presentes na amostra irá crescer e ser detectada na dependência dessas variáveis. Esses resultados também podem apresentar grandes variações entre diferentes locais, épocas do ano e mesmo entre amostragens consecutivas realizadas no mesmo local (BARTRAM, 2003).

A presente Norma apresenta a técnica de inoculação em profundidade (pour plate), recomendada pela legislação americana (ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2004) para contagem de bactérias heterotróficas em água, seguindo os métodos descritos no "Standard Methods" (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998).

## 1. Objetivos

Esta Norma prescreve o método para determinação da densidade de bactérias heterotróficas em água por meio da técnica de inoculação em profundidade, como instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

- a) Avaliar alterações na qualidade da água tratada no sistema de distribuição e armazenamento e também as condições de limpeza do sistema de distribuição;
- b) Avaliar a eficiência das diversas etapas de operação das estações de tratamento de água na remoção de bactérias;
- c) Avaliar as características microbiológicas de águas minerais naturais e águas naturais na fonte ou poço;
- d) Avaliar as condições higiênicas e de proteção de poços, fontes e reservatórios;
- e) Avaliar a possível interferência na determinação de coliformes em águas quando o método analítico utilizado na determinação desses microrganismos basear-se na fermentação da lactose;
- f) Avaliar as condições higiênicas e da eficiência de operação de piscinas.

## 2. Documentos Complementares

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) Normas Técnicas CETESB:
  - L5.216 – Controle de qualidade de meios de cultura - Método de Ensaio. CETESB, 1987.
  - M1.001–Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia Procedimento. CETESB, 1986.

- b) Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. CETESB, 1988.
- c) Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water. UNITED STATES. EPA 1997.

### **3. Definições**

Para os efeitos desta Norma, são adotadas as definições de **3.1** a **3.3**.

#### **3.1 - Bactérias heterotróficas:**

Bactérias que requerem um ou mais compostos orgânicos como fonte de carbono.

#### **3.2 - Densidade bacteriana:**

Número de unidades formadoras de colônias de bactérias por unidade de volume (UFC/mL).

#### **3.3 - Técnica de inoculação em profundidade (pour plate):**

Técnica que consiste na adição do meio de cultura fundido e estabilizado à temperatura de  $45^{\circ} \pm 1^{\circ}C$  ao inóculo da amostra.

### **4. Aparelhagem**

#### **4.1 - Equipamentos**

##### **4.1.1 - Balança**

Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g. 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 e sua calibração deve ser feita periodicamente.

##### **4.1.2 - Banho-maria**

Equipado com termostato para manter a temperatura uniforme ( $45 \pm 1^{\circ}C$ ) em todos os pontos, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo o meio de cultura, o qual após fusão prévia, deve ter sua temperatura estabilizada nessa faixa no momento do uso. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de  $1^{\circ}C$  ou menos.

##### **4.1.3 - Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)**

Deve ser equipada com filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,995 para partículas iguais ou maiores que  $0,3\mu m$ . O ar estéril produzido deve ser dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, para proporcionar segurança nos manuseios que devam ser realizados em condições de esterilidade, como também proteção aos operadores.

##### **4.1.4 - Contador de colônias**

Deve ser utilizado um contador de colônias tipo Quebec, de preferência de campo escuro, e que forneça aumento equivalente a 1,5 diâmetros.

**4.1.5 - Destilador de água ou aparelho para desionização.**

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana no Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water (UNITED STATES. EPA,1997).

**4.1.6 - Equipamentos para esterilização.****4.1.6.1 - Autoclave**

Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.<sup>1</sup>

**4.1.6.2 - Estufa (forno) para esterilização**

Deve manter a temperatura de 170 a 180°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

**4.1.7 - Incubadora microbiológica equipada com termostato para operar a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$** 

Deve manter a temperatura na faixa de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 0,5°C ou menos e estar imerso em líquido.

**4.1.8 - Potenciômetro**

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH.

**4.1.9 - Refrigerador**

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, e ter capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de 1°C ou menos.

**4.1.10 - Termômetros**

Devem ter escala adequada ao uso e a coluna de mercúrio não deve apresentar interrupções. Também podem ser utilizados termômetros eletrônicos digitais, desde que apresentem faixa, sensibilidade e exatidão adequadas.

**4.1.11 - Placa aquecedora**

Com temperatura regulável.

**4.2 - Vidraria e material plástico****4.2.1 - Frascos para água de diluição**

De vidro neutro, de borossilicato ou de plástico autoclavável, com tampas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis. Devem ter volume suficiente para conter 90

---

<sup>1</sup> As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

± 2mL de água de diluição, deixando um espaço para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

#### **4.2.2 - Frasco para coleta de amostra**

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

#### **4.2.3 - Pipetas<sup>2</sup>**

De borossilicato de 1 ou 2mL, com graduação de 1/10mL e erro volumétrico inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis, de plástico não tóxico, estéreis.

#### **4.2.4 - Ponteiras**

Ponteiras de polipropileno estéreis para pipetadores automáticos de 1000µL.

#### **4.2.5 - Placas de Petri**

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou de vidro neutro de boa qualidade, com 100mm de diâmetro e 15mm de altura ou de plástico não tóxico, de 90 mm de diâmetro e 15mm de altura.

#### **4.2.6 - Tubos de ensaio**

De borossilicato (pyrex) ou de vidro neutro, com tampa de rosca de material não tóxico, com capacidade adequada para conter 12 a 15mL do meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 15x150mm).

### **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 - Pipetador automático de 1000mL**

Calibrados periodicamente e com erro inferior a 2,5%.

#### **4.3.3 - Caixas ou cestas de aço inoxidável**

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

#### **4.3.4 - Estojo para pipetas**

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

#### **4.3.5 - Canecas**

Em alumínio ou aço inoxidável, e dimensões adequadas para comportar os tubos de ensaio contendo o meio de cultura a ser fundido.

## **5 - Meios de Cultura e Soluções**

### **5.1 - Ágar tripton glicose extrato de levedura ("Plate Count Agar")**

---

<sup>2</sup> Em alternativa à utilização de pipetas de vidro ou descartáveis pode ser utilizado pipetador automático de 1000µL com ponteiras de polipropileno, estéreis, específicas para o micropipetador

**5.1.1 – Fórmula:**

Triptona (digerido enzimático de caseína).....	5,0g
Extrato de levedura.....	2,5g
Dextrose .....	1,0g
Ágar .....	15,0g
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização.....	7,0 ± 0,2 a 25°C

*Observação: Podem também ser utilizados os meios de cultura descritos no item 8.*

**5.1.2 – Preparo**

Pesar 23,5g do meio desidratado “Plate Count Agar” e acrescentar 1000mL 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. Se necessário, ajustar o pH com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N). Distribuir volumes de 12 a 15mL em tubos de 15mm x 150mm com tampa de rosca e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**5.1.3 – Armazenamento**

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira durante, no máximo, 3 meses.

**5.2 - Água de diluição****5.2.1 - Fórmula:**

Solução-estoque A.....	1,25mL
Solução-estoque B.....	5,0mL
Água destilada q.s.p. ....	1000mL
pH final após esterilização:.....	7,2 ± 0,1

**5.2.2 - Preparo:**

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

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	34,0g
Água destilada q.s.p. ....	1000mL

Preparo: Dissolver o fosfato de potássio com 500mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,5 com solução de hidróxido de sódio 1 N e completar o volume para um 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.<sup>3</sup>

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

Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O) .....	81,1g
--	-------

<sup>3</sup> 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.

Água destilada q.s.p. .... 1000mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada e completar o volume para um litro. Distribuir volumes que sejam adequados às necessidades de uso no laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira;

c) Adicionar 1,25mL da solução-estoque A a 5mL da solução-estoque B e completar o volume para um litro com água destilada;

Distribuir em frascos de diluição quantidades adequadas para que o volume final, após a esterilização seja de  $90 \pm 2$ mL;

d) Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos.

### 5.3 - Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N)

#### 5.3.1 - Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH)..... 40,0g  
 Água destilada q.s.p. .... 1000mL

#### 5.3.2 – Preparo

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

## 6.Execução do Ensaio

### 6.1 - Princípio do método

A técnica de inoculação em profundidade para contagem de bactérias heterotróficas baseia-se na inoculação de volumes adequados da amostra em placas de Petri, com posterior adição do meio de cultura triptona glicose extrato de levedura ("plate count agar"). Após 48 horas de incubação a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , as bactérias viáveis presentes na amostra, que possam se desenvolver nessas condições, irão formar colônias que serão contadas com o auxílio de um contador tipo Quebec ou similar.

### 6.2 - Amostragem

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

### 6.3 – Procedimento:

6.3.1 - Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório ou da capela de fluxo laminar usando um desinfetante que não deixe resíduos;

6.3.2 - Proceder inicialmente à fusão do ágar triptona glicose extrato de levedura, conforme descrito abaixo:

- a) colocar os tubos contendo o meio de cultura em um recipiente (caneca), contendo água que atinja a altura do meio de cultura<sup>4</sup>;
- b) fundir com chapa aquecedora ou bico de Bunsen;
- c) desligar a chapa ou o bico de Bunsen tão logo o meio esteja fundido, para evitar que a água entre em estado de ebulição e também que ocorra contaminação pelo vapor formado;
- d) colocar o recipiente contendo os tubos com o meio fundido em banho-maria à temperatura de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  para estabilização da temperatura.

**6.3.3** - 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 da amostra, o volume a ser inoculado e a data.

**6.3.4** - Homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, de modo a formar um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$  entre o braço e o antebraço.

**6.3.5** - Com uma pipeta estéril de 1 ou 2mL (ou micropipetador de 1000 $\mu\text{L}$ ) e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir volumes em duplicata de 1mL da amostra para as placas de Petri correspondentes, inclinando a pipeta em um ângulo de  $45^\circ$  tocando o fundo da placa.

**6.3.6** - Se for necessário examinar volumes decimais inferiores a 1mL da amostra, definir esses volumes em função da sua procedência, para que nas contagens possam ser obtidos valores na faixa de 30 a 300 UFC e preparar as diluições conforme descrito abaixo:

- a) identificar os frascos de diluição;
- b) homogeneizar a amostra (como em **6.3.4**) e, com uma pipeta de 10mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco contendo  $90 \pm 2\text{mL}$  de água de diluição. Prepara-se assim, a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1mL dela corresponde a 0,1mL da amostra;
- c) com uma pipeta de 1mL, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1mL da primeira diluição ( $10^{-1}$ ) para cada placa da duplicata correspondente;
- d) homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) (como em **6.3.4**) e com uma nova pipeta de 10mL esterilizada, transferir 10mL para um novo frasco de diluição contendo  $90 \pm 2\text{mL}$  de água de diluição, obtendo-se assim a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1mL dela corresponde a 0,01mL da amostra;
- e) com uma pipeta estéril de 1mL, inocular 1mL da segunda diluição ( $10^{-2}$ ) para cada placa da duplicata correspondente;
- f) proceder dessa maneira na seqüência de diluições desejadas ( $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, \dots, 10^{-n}$ );

**6.3.7** - Após a inoculação de todos os volumes requeridos da amostra, com todos os cuidados de assepsia, entreabrir cada placa e acrescentar 12mL do meio de cultura previamente fundido e

---

<sup>4</sup> Fundir o meio apenas uma vez

mantido em banho-maria para a estabilização da temperatura a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , tendo o cuidado de secar a parte externa do tubo e flambar o seu bocal antes de verter o meio de cultura na placa<sup>5, 6</sup>;

**6.3.8** - Homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contidos na placa com movimentos circulares em forma de oito, aproximadamente dez vezes consecutivas. Esses movimentos devem ser moderados, para evitar a projeção do líquido contra as paredes e a tampa da placa. Deixar as placas em repouso para que o meio de cultura se solidifique;

**6.3.9** - Incubar as placas a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $48 \pm 3\text{h}$ , em posição invertida, para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio de cultura;

**6.3.10** - Após o período de incubação, efetuar a leitura das placas com o auxílio de um contador de colônias e calcular a densidade de bactérias heterotróficas conforme descrito no **item 7.1**.

## 7.Resultados

### 7.1 - Cálculo da densidade de bactérias heterotróficas

**7.1.1** - Selecionar para leitura as placas em duplicata correspondentes ao volume inoculado que tenham fornecido contagens entre 30 e 300 colônias. Calcular a média aritmética das contagens e multiplicar o valor pelo inverso da diluição utilizada;

Exemplo: Para uma amostra, cujo volume selecionado foi 0,001mL (diluição  $10^{-3}$ ) e os valores obtidos foram 40 e 46 colônias, calcular conforme descrito abaixo:

$$\frac{\text{Soma dos valores das duplicatas}}{2} \times \text{inverso da diluição} = \text{densidade de bactérias heterotróficas/mL}$$

$$\frac{40 + 46}{2} \times 10^3 = 43.000\text{UFC/mL}$$

**7.1.2** - Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens inferiores a 30, efetuar as contagens na duplicata correspondente ao maior volume. Calcular a média aritmética e multiplicar o valor pelo inverso da diluição utilizada;

**7.1.3** - Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, porém o menor volume inoculado fornecer contagens próximas a 300, efetuar as contagens nas placas correspondentes a esse volume. Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada;

**7.1.4** - Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens muito superiores a 300, há três casos a serem considerados:

**7.1.4.1** - Placas com menos de 10 colônias por  $\text{cm}^2$ : efetuar as contagens em  $13\text{cm}^2$  (13 quadrados do contador de colônias<sup>7</sup>), que apresentem distribuição representativa de colônias, em cada uma das

<sup>5</sup>O tempo entre o preparo da diluição ou inoculação da primeira amostra nas placas até a dosagem do meio de cultura na última amostra não deve ultrapassar 20 minutos.

<sup>6</sup> Antes da dosagem do meio de cultura, verificar sua temperatura colocando um termômetro dentro de um tubo com o meio

placas em duplicata correspondentes ao volume selecionado para a contagem. Multiplicar a soma das contagens de cada placa por 5 quando a área da placa for de 65cm<sup>2</sup> (placa de vidro), ou por 4,4 quando a área for 57cm<sup>2</sup> (placa de plástico). Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada nessas placas;

Exemplo: Quando o volume cuja leitura efetuada foi 0,1mL (diluição 10<sup>-1</sup>) e as somas dos 13 quadrados obtidos no contador para cada placa (de vidro) foram 116 e 98, multiplicar o valor de cada placa por 5. Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição.

**Soma dos valores dos 13 quadrados da placa x 5 = densidade de bactérias heterotróficas/placa**

**Soma dos valores das duplicatas x inverso da diluição = densidade de bactérias heterotróficas/mL**  
2

$$\frac{(116 \times 5) + (98 \times 5)}{2} \times 10 = 5.350$$

**7.1.4.2** - Placas com 10 a 100 colônias por cm<sup>2</sup>: efetuar a contagem em quatro quadrados representativos (4cm<sup>2</sup>) em cada uma das placas da duplicata selecionada para leitura. Calcular a média aritmética das contagens por cm<sup>2</sup> para cada placa e multiplicar cada resultado pela área da placa em cm<sup>2</sup>; 65 para placas de vidro e 57 para placas de plástico;

Exemplo: Para uma amostra cujo volume selecionado foi 0,1mL (diluição 10<sup>-1</sup>), e os valores dos quatro quadrados das duplicatas foram 50, 40, 43, 37 e 36, 44, 42, 38 em placas de plástico, calcular conforme segue:

**Soma dos valores dos 4 quadrados x área da placa = densidade de bactérias heterotróficas/placa**  
4

$$\frac{50 + 40 + 43 + 37}{4} \times 57 = 2.422,5$$

$$\frac{36 + 44 + 42 + 38}{4} \times 57 = 2.280$$

**Soma dos valores das duplicatas x inverso da diluição = densidade de bactérias heterotróficas/mL**  
2

$$\frac{2422,5 + 2.280}{2} \times 10 = 23.512,5$$

**7.1.5** - Caso sejam encontradas colônias invasoras a contagem deverá ser realizada em porções representativas, livres das colônias invasoras, respeitando-se as seguintes condições: as colônias a serem contadas estiverem bem distribuídas nessas áreas representativas; quando a área coberta pelas colônias invasoras não exceder à metade da área da placa.

<sup>7</sup> Se possível, selecionar, para essa contagem, sete quadrados consecutivos horizontalmente e seis quadrados consecutivos verticalmente, tomando cuidado para não contar o mesmo quadrado duas vezes

## 7.2 - Expressão dos resultados

**7.2.1-** Expressar o resultado em termos de unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas por mililitro (UFC/mL);

**7.2.2-** Procedimentos de arredondamento para obtenção do resultado final.

Quando os resultados das médias das placas forem superiores a 100, efetuar o arredondamento, de tal modo que o resultado final apresente apenas dois algarismos significativos, segundo as seguintes regras:

- a) Considerando apenas os dois primeiros algarismos da esquerda, efetuar o arredondamento do segundo algarismo para cima, quando o terceiro for igual ou superior a 5, e para baixo, quando o mesmo for inferior a 5;
- b) Acrescentar zeros para cada algarismo adicionado ao segundo algarismo da direita, por exemplo uma contagem de 142 é expressa como 140, e uma contagem de 155 como 160, da mesma maneira que uma contagem de 1349 é expressa como 1300, e uma contagem de 1350 é expressa como 1400;
- c) Quando os resultados das médias das placas forem inferiores a 100, não há necessidade de se fazer arredondamento para o resultado final, por exemplo uma contagem de 35 é expressa como 35. Entretanto, quando o resultado da média apresentar valor 5 após a vírgula, é feito o arredondamento para cima do algarismo antes da vírgula, por exemplo uma média de contagem 68,5 é expressa como 69 ou uma média de 0,5 é expressa como 1.

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

**7.2.4 -** Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem mais que 100 colônias por cm<sup>2</sup>, expressar o resultado como >6500 para placas de vidro ou como >5700 para placas de plástico, multiplicado pelo inverso do menor volume inoculado (exemplo: para uma amostra cujo menor volume inoculado foi 0,01mL, o resultado é expresso como >650000 (placas de vidro) ou >570000 UFC/mL (placas de plástico)<sup>8</sup>.

## 8 - Meios de Cultura Alternativos para Determinação da Densidade de Bactérias Heterotróficas em Água

Estudos têm demonstrado que a recuperação de bactérias heterotróficas em amostras de águas oligotróficas vêm sendo superior quando são utilizados meios de cultura mais pobres em fontes de carbono e nitrogênio, com incubação em temperaturas mais baixas e por tempos mais longos; portanto meios mais pobres como R2A e Ágar NWRI têm mostrado maior recuperação de bactéria heterotróficas quando incubados por longo tempo. Assim sendo, quando se deseja fazer um estudo com bactérias heterotróficas, onde não se necessita rapidez nos resultados, é recomendável a utilização desses meios com a determinação prévia do tempo e da temperatura de incubação ideais.

---

<sup>8</sup> Neste caso, o resultado deve ser expresso como "contagem estimada".

## 8.1 - Ágar R2A

### 8.1.1 Fórmula

Extrato de levedura	0,5 g
Proteose peptona nº 3 ou polipeptona	0,5 g
"Casamino acids".....	0,5 g
Glicose.....	0,5 g
Amido solúvel.....	0,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	0,3 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O).....	0,05 g
Piruvato de sódio.....	0,3 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL

### 8.1.2 – Preparo

Pesar os ingredientes, com exceção do ágar e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 7,2 com o monohidrogeno fosfato de potássio ou dihidrogeno fosfato de potássio sólido e acrescentar o ágar, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente, até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 8.1.3 – Uso

Esse meio de cultura é utilizado nos métodos de inoculação em profundidade, inoculação em superfície e de membrana filtrante e a recomendação de temperatura e tempo de incubação variam entre 20 a 28°C e cinco a sete dias, respectivamente.

## 8.2 - Ágar NWRI

### 8-2.1 - Fórmula:

Peptona.....	3,0 g
Caseína solúvel.....	0,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	0,2 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O).....	0,05 g
Cloreto férrico (FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O).....	0,001 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000mL

### 8.2.2 – Preparo

Ajustar o pH para 7,2 antes da autoclavagem por 15 minutos a 121°C.

### 8.2.3 – Uso

Esse meio de cultura é utilizado nos métodos de inoculação em profundidade, inoculação em superfície e de membrana filtrante e a recomendação de temperatura e tempo de incubação variam entre 20 a 28°C e cinco a sete dias, respectivamente.

## 9 - Referências

ALLEN, M.; EDBERG, S.C.; REASONER, D.J. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria - what is their significance in drinking water? In: NSF INTERNATIONAL/ WHO SYMPOSIUM ON HPC IN DRINKING WATER. PUBLIC HEALTH IMPLICATIONS?. 2002, Genebra, Suíça. **Conference Proceeding...** [S.L.]: NSF:WHO, 2002. p. 29-45.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>th</sup> Washington: APHA:AWWA: WEF, 1998.

BARTRAM J. et al. (Eds). **Heterotrophic plate counts and drinking water safety: the significance of HPCs for water quality and human health**. Londres: WHO:IWA, 2003. Expert Consensus. Expert meeting group.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Disponível em: <

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria 518 de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em: <

CETESB (São Paulo). **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, 1988. 150 p.

\_\_\_\_\_. **L5.216**: controle de qualidade de meios de cultura: método de ensaio. São Paulo, 1987. 36 p. Norma técnica.

\_\_\_\_\_. **M1.001**: lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia: procedimento. São Paulo, 1986. 34 p. Norma técnica.

ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS: title 40: protection of environment. Chapter I: Environmental Protection Agency, Subchapter D: Water Programs, Part 141: Primary drinking water regulations, §141.74: Analytical and monitoring requirements. 29 julho 2004. Disponível em: <<http://www.gpoaccess.gov/ecfr/>>. Acesso em: 13 set. 2004.

STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS. **The microbiology of drinking water: water quality and public health - part 1**. Nottingham: Environment Agency, 2002. Disponível em: <<http://www.environment-agency.gov.uk/science/>>. Acesso em: 13 set. 2004.

UNITED STATES. EPA. **Microbiological methods for monitoring the environment. Water and wastes.** Cincinnati, Ohio, 1978.

UNITED STATES. EPA. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water.** 4<sup>th</sup> ed. Cincinnati, Ohio, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines for drinking water quality.**

Nottingham, 2003. Chapter 7. Draft. Disponível em:

<[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/guidelines/3<sup>rd</sup>/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/3<sup>rd</sup>/en/)>. Acesso em: 13 set. 2004.

---