



NORMA TÉCNICA

L5.220

Dez/2001
33 PÁGINAS

Pseudomonas aeruginosa - determinação do numero mais provável pela técnica de tubos múltiplos: 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)



CETESB

Pseudomonas aeruginosa
**DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS
PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS**

(Método de Ensaio)

**L5.220
dez/2001**

SUMÁRIO

Página

Introdução.....	01
1. Objetivos	02
2. Documento complementar	02
3. Definições.....	02
4. Aparelhagem	03
5. Meios de culturas e soluções	06
6. Execução do ensaio	09
7. Resultado	18
8. Referências bibliográficas	25
Anexo A – Caracterização bioquímica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Anexo B – Recomendações de ordem geral.....	33

Introdução

A versatilidade bioquímica da *Pseudomonas aeruginosa* e sua resistência a agentes anti-bacterianos são fatores que têm determinado um grande interesse em seu estudo, pois contribuem para sua importância como patógeno secundário, como organismo formador de limo, interferindo em muitos processos industriais e como microrganismo de importância em processos de deterioração, atacando uma variedade de materiais.

No homem, sua presença foi correlacionada pela primeira vez com problemas de infecção em 1882 por Gessard, que isolou esse microrganismo em dois casos de ferida purulenta. Atualmente é bem documentado seu papel como patógeno oportunista, sendo reconhecido como responsável por septicemia fatais em crianças e pacientes adultos que sofreram queimaduras graves ou que se encontram debilitados por câncer, diabetes mellitus ou idade avançada. Tem sido estabelecida também a relação entre *Pseudomonas aeruginosa* e infecção do ouvido externo, observando-se que a frequência de isolamento aumenta em função da severidade da infecção.

Nos últimos anos seu estudo em águas de piscina tem merecido uma atenção especial e esse interesse deriva do fato de pesquisas recentes terem evidenciado a relação entre a alta incidência de otite externa em nadadores e a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nessas águas recreacionais. A contaminação dessas águas por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser decorrente de sua introdução através da pele de banhistas, de superfície da pele contaminada por matéria fecal (principalmente em crianças), da urina ou de contaminação da própria fonte de água que abastece as piscinas.

Estudos recentes relativos à pesquisa dessa bactéria em águas poluídas e não poluídas sugerem que sua presença esteja relacionada ao homem, seus esgotos domésticos e industriais, e animais a ele associados. Em águas tratadas, embora provavelmente constituam um veículo inadequado para o transporte dessa bactéria, sua detecção tem sido relatada em numerosos casos.

Em vista da importância de *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno oportunista e da atual falta de correlação entre a sua presença e a de outras bactérias indicadoras de contaminação fecal, é recomendada sua pesquisa como um exame complementar para avaliação da qualidade de águas destinadas ao abastecimento público e, principalmente, de águas recreacionais. Em relação ao abastecimento industrial a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* assume importância em função de sua capacidade de formar limo, que pode causar interferência em muitos processos e, particularmente, em indústrias farmacêuticas, pela possibilidade de contaminação de medicamentos e cosméticos.

1. Objetivos

Esta Norma prescreve a metodologia para a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de tubos múltiplos, com aplicação na:

- a) Avaliação da qualidade de águas minerais;
- b) Avaliação da qualidade de águas destinadas ao abastecimento público;
- c) Avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas;
- d) Avaliação da qualidade de águas industriais, particularmente de indústrias farmacêuticas;

2. Documentos complementares

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- Norma CETESB M1.001 – Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.
- Norma CETESB L5.216 – Controle de qualidade de meios de cultura.
- Guia de Coleta de Amostra de Água, CETESB, 1988.

3. Definições

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.7.

3.1 Ágar leite

Meio seletivo em que a hidrólise da caseína do leite, evidenciada pela formação de um halo ao redor da colônia e a produção de um pigmento esverdeado, difusível no meio, constituem resultados positivos para *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.3 Caldo Acetamida

Meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa* no qual seu crescimento a partir da utilização da acetamida (única fonte de carbono e nitrogênio presente nesse meio) determina a alcalinização, que é evidenciada pela coloração púrpura decorrente da viragem do indicador de pH (vermelho de fenol).

3.4 Caldo Asparagina

Meio seletivo em que a asparagina atua como única fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento de *Pseudomonas* nesse meio é evidenciado por turvação e produção de um pigmento fluorescente esverdeado, difusível no meio, que pode ser demonstrada através de luz ultravioleta de ondas longas (luz negra).

3.5 Número mais provável (NMP)

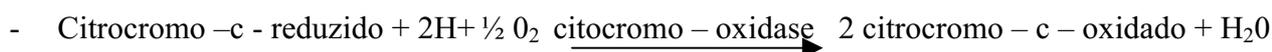
É a estimativa de densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos por meio da aplicação da técnica de tubos múltiplos.

3.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilos Gram – negativos, estritos, com 0,5 a 0,8µm de diâmetro por 1,5 a 3,0µm de comprimento, podendo ocorrer isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Móveis por flagelação polar monotríquia, sendo que, eventualmente, as células podem ter dois ou mais flagelos polares. Produzem pigmentos fluorescentes e piocianina, entretanto, podem ser encontradas culturas apiocianogênicas. Crescem a 37° e a 42°C, mas não a 4°C. Apresentam metabolismo oxidativo positivo. Desnitricam o nitrato, hidrolisam a gelatina e a caseína, mas não o amido. São hemolíticos, produzem arginina desidrolase, oxidam o gluconato, e utilizam como fonte de carbono, arginina, acetamida, geraniol, manitol, gluconato mas não glicolato e sacarose.

3.7 Teste de oxidase

Este teste tem por finalidade evidenciar a presença da citocromo – oxidase, uma enzima da cadeia respiratória de certas bactérias. Essa enzima é necessária para a oxidação do citocromo-C, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo – c – oxidado sofre redução, ocorrendo a oxidação do tetrametil – p – fenilenodiamina, formando-se uma substância de coloração azul. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta resultado positivo nesse teste.

4. Aparelhagem

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

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

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

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipiente contendo meios de cultura cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para deionização

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

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 500 UFC/100mL (Unidades Formadoras de Colônias), devendo esse controle ser realizado mensalmente.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103393 pA (1.05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²) produzindo em seu interior uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar, no máximo, uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.4.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura na faixa de 170 \pm 10°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas).

4.1.5 Incubadora bacteriológica termostatizada

Deve manter a temperatura na faixa de 35 \pm 0,5° C e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C.²

4.1.6 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0; pH = 7.0)

4.1.7 Refrigerador

Deve manter a temperatura entre 2° a 8° C, devendo sua temperatura ser verificada pelo menos uma vez ao dia.

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

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

² A verificação da temperatura da incubadora deve ser feita periodicamente (mínima de duas vezes ao dia) por meio de termômetro (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocado em ponto representativo, sendo aconselhável, também, a colocação de um termômetro de máxima e mínima em sua parte central.

4.2.2 Frasco para água de diluição

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

4.2.3 Frasco para coleta de amostra

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

4.2.4 Pipetas

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

4.2.5 Tubos de ensaio

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

4.2.6 Placas de Petri

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

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, de platina-irídio ou de platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7-8 cm de comprimento, com uma erro de 3 mm de diâmetro em uma das extremidades, sendo a outra fixada a um cabo metálico (cabo de Kolle).³

4.3.2 Bicos de Bunsen ou similar

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

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável.

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.4 Estantes

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaios a serem empregados na análise.

4.3.5 Estojo para pipetas

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

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

4.3.6 Lâmpada ultravioleta (luz ultravioleta ondas longas – luz negra)

A lâmpada deve ser colocada no interior de uma caixa de madeira ou de outro material que permita sua adaptação. As paredes internas da caixa devem ser pintadas de preto e o seu teto deve ter uma abertura que permita a colocação da culturas contidas no tubo de ensaio, para a verificação da produção de pigmentos fluorescentes .

5. Meios de culturas e soluções

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

5.1 Caldo Asparagina em concentração dupla

5.1.1 Fórmula

Asparagina (D.L.).....	6,0g
Fosfato dipotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.....	2,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O) p.a.....	1,0g
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização: 6,9 a 7,2	

5.1.2 Preparo

Pesar os reagentes e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a sua completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18mm x 180mm, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴

5.1.3 Armazenamento

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

5.2 Caldo Asparagina em concentração simples

5.2.1 Fórmula

Asparagina.....	3,0g
Fosfato dipotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.....	1,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O) p.a.....	0,5g
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização: 6, 9 a 7, 2	

⁴ No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e a esterilização não deve exceder duas horas.

5.2.2 Preparo

Pesar os reagentes e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a sua completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18mm x 180mm, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴

5.2.3 Armazenamento

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

5.3 Caldo asparagina em concentração tripla**5.3.1 Fórmula**

Asparagina.....	9,0g
Fosfato dipotássico anidro(K ₂ HPO ₄) p.a.....	3,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O) p.a.....	1,5g
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização: 6, 9 a 7, 2	

5.3.2 Preparo

Pesar os reagentes e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a sua completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em frasco ou tubos apropriados (volume total de 30mL), distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴

Nota: Esse meio será utilizado quando forem requeridas inoculações de 20mL de amostra.

5.4 Caldo acetamida**5.4.1 Fórmula**

Acetamida.....	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0
Fosfato dipotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.....	1,39g
Fosfato monopotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.....	0,73g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O) p.a.....	0,5g
Vermelho de fenol.....	0,012g
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização: 6,9 a 7,2	

5.4.2 Preparo

Pesar os reagentes e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a sua completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em frasco ou tubos apropriados (volume total de 30mL), distribuir volumes adequados

para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴

5.4.3 Armazenamento

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

5.5 Ágar leite

5.5.1 Fórmula

Solução 1.....	500mL
Solução 2.....	500mL
Água destilada.....	1000mL

5.5.2 Preparo

Este meio deve ser preparado como segue:

- a) Preparar a solução 1, com a seguinte composição:

Leite em pó desnatado.....	100g
Água destilada.....	500mL

Pesar 100g de leite em pó desnatado e acrescentar uma pequena quantidade de água destilada fria. Misturar bem até que uma pasta homogênea seja obtida. Adicionar a essa pasta o restante da água destilada. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴ Após a esterilização, manter a solução em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura, até o momento de sua adição à solução 2.

- b) Preparar a solução 2, com a seguinte composição:

Caldo nutriente desidratado.....	12,5g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	2,5g
Ágar	15,0g
Água destilada.....	500mL

Pesar 12,5g do meio desidratado “ Nutrient Broth” e os outros reagentes e acrescentar 500mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁴ Após a esterilização colocar em banho-maria a 55°C para estabilização da temperatura do meio de cultura preparado.

- c) Juntar as soluções 1 e 2, com todos os cuidados de assepsia e distribuir volumes de, aproximadamente, 20mL nas placas de Petri estéreis.

5.5.2 Armazenamento

Após a solidificação do meio, embrulhar as placas de Petri com papel Kraft e manter em refrigerador durante, no máximo, duas semanas.

5.6 Água de diluição

5.6.1 Fórmula

Solução-estoque A.....	1,25mL
------------------------	--------

Solução-estoque B.....	5,00mL
Água destilada.....	1000mL

5.6.2 Preparo

- a) preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:
- | | |
|---|--------|
| Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄) p.a..... | 34g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000mL |
- Dissolver o fosfato monopotássico em 500mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados às necessidades do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.⁵
- b) Preparar a solução-estoque B, com a seguinte composição:
- | | |
|---|--------|
| Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)..... | 81,1g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000mL |
- Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados às necessidades do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.
- c) Adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B a um litro de água destilada, e homogeneizar.
- d) Distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 90 ± 2 mL;
- e) Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.
- f) Armazenar à temperatura ambiente.

5.7 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.7.1 Fórmula

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40g
Água recém-destilada.....	1000mL

5.7.2 Preparo

Pesar 40g de hidróxido de sódio e dissolver em 1000mL de água recém-destilada. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

6. Execução do ensaio

6.1 Princípio do método

A determinação do número mais provável (NMP) de *Pseudomonas aeruginosa* em uma amostra é efetuada a partir de aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas, uniformemente distribuídas na amostra. Consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos

⁵ Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez ou presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos cuja sementeira fornece resultados negativos em, pelo menos, um tubo da série em que foram inoculados. A combinação de resultado positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade das bactérias pesquisadas, por meio da aplicação de cálculos de probabilidade. Para análises de águas tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1mL da amostra, usando-se séries de cinco tubos para cada volume a ser inoculado.

6.2 Etapas do método

O exame para a determinação de *Pseudomonas aeruginosa* se processa em duas etapas: o ensaio presuntivo e o confirmativo.

6.2.1 Ensaio presuntivo

Consiste na inoculação de volumes determinados da amostra em séries de tubo de caldo asparagina, que são incubados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. A produção de um pigmento fluorescente verde, evidenciada por meio da leitura dos tubos sob luz ultravioleta de ondas longas (luz negra), constitui resultado positivo para o ensaio presuntivo.

6.2.2 Ensaio confirmativo

Consiste na transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo (produção de pigmento fluorescente verde em caldo asparagina após 24-48 h a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), para caldo acetamida, sendo a incubação efetuada também a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. A alcalinização do meio, evidenciada pela sua coloração púrpura, constitui resultado confirmativo positivo para a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Nota : Devido à possibilidade de ocorrência de resultados falso – positivos no caldo acetamida, é recomendável que a positividade das culturas nesse meio seja confirmada mediante a transferência de um inóculo das mesmas para agar leite, com posterior incubação a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. A hidrólise da caseína do leite, evidenciada pela formação de halo ao redor da colônia e a produção de um pigmento esverdeado, difusível no meio, são resultados positivos em agar leite que confirmam a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.3 Amostragem

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

6.3.1 Amostra

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

6.3.1.2. Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5mg/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. Nesses casos, podem ser utilizados volumes de 0,1mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15mg/L de cloro residual.

- 6.3.1.3. Agentes quelantes:** para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3mL de uma solução a 15% de EDTA (pH final=6,5) para cada 100mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1mL de uma solução a 10% por 100mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente, ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.
- 6.3.1.4. Transporte e conservação:** após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a coleta e o início do exame é de oito horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

6.4. Procedimento

- 6.4.1.** Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem inoculados, em função de sua procedência, tendo em vista as seguintes considerações:
- A técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1mL da amostra, sendo cada volume inoculado em uma série de cinco tubos. A seleção desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de *Pseudomonas aeruginosa* presente na amostra ou em dados prévios sobre ela), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado com o menor volume selecionado forneça resultado negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável, para amostras desconhecidas, a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.
 - Para águas de boa qualidade (águas tratadas para consumo humano, águas minerais, etc.), nas quais é esperada a ausência dessa bactéria ou sua presença em baixas densidades, o ensaio pode ser simplificado, efetuando-se a inoculação de apenas dez volumes de 10mL da amostra ou, ainda, cinco volumes de 20mL da mesma.
- 6.4.2.** Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando um desinfetante que não deixe resíduos.
- 6.4.3.** Realizar o ensaio presuntivo, conforme especificado em 6.4.4 a 6.4.21.
- 6.4.4.** Preparar os tubos de caldo asparagina requeridos para o ensaio, conforme definido em 6.4.1, colocando-os em estantes, em fileira de cinco tubos.

Nota: Quando as inoculações forem de 10 porções de 10mL, dispor para cada amostra dez tubos de caldo asparagina em concentração dupla; para as inoculações de 5 porções de 20mL, dispor para cada amostra, cinco tubos de caldo asparagina em concentração tripla.

- 6.4.5.** Proceder à identificação dos tubos, anotando no primeiro tubo à direita na primeira fileira o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado.
- 6.4.6.** Homogeneizar a amostra por agitação manual, inclinando o frasco formando um ângulo de aproximadamente 45° (entre o braço e o antebraço) e agitando vigorosamente. Repetir a operação no mínimo 25 vezes.
- 6.4.7.** Com um pipeta esterilizada de 10mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco antecipadamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição. Prepara-se assim, a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1mL dela corresponde a 0,1mL da amostra (ver figura 1).

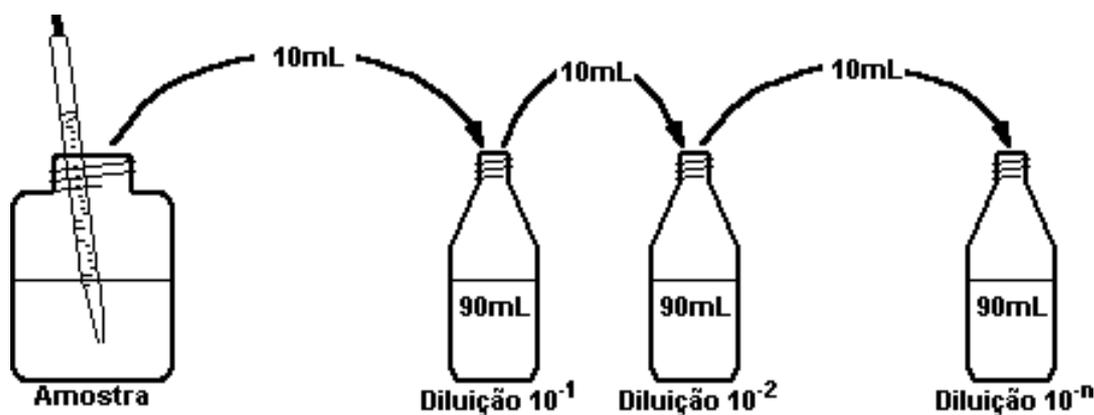


FIGURA 1 – Preparo das diluições decimais

- 6.4.8.** Com a mesma pipeta, semear 10mL da amostra em cada um dos tubos de caldo asparagina em concentração dupla, quando esse volume for requerido para o teste (ver figura 2).
- 6.4.9.** Desprezar a pipeta de 10mL e com uma pipeta de 5mL, inocular 1mL da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo.
- 6.4.10.** Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição (10^{-1}) como em 6.4.6 e, com um nova pipeta esterilizada, transferir 10mL para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1mL dela corresponde a 0,01mL da amostra.
- 6.4.11.** Proceder dessa maneira na seqüência de diluição desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-n}).

Nota: A figura 1 sintetiza o procedimento relativo ao preparo das diluições decimais seriadas.

FIGURA 2 – Ensaio presuntivo – Inoculação dos volumes da amostra e de suas diluições decimais

6.4.12. Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo seqüência decrescente (da maior para a menor diluição efetuada).

6.4.13. Agitar vigorosamente 25 vezes o frasco com a última diluição efetuada e, com uma pipeta estéril de 5mL, inocular 1mL da diluição em cada um dos tubos de caldo asparagina em concentração simples, correspondentes a essa diluição.

6.4.14. Proceder dessa maneira, semeando de trás para frente, sempre com a mesma pipeta, da maior para a menor diluição.

Nota: A figura 2 sintetiza o procedimento relativo à inoculação dos volumes da amostra e das suas diluições decimais.

6.4.15. Após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o ensaio, colocar a estante contendo os tubos inoculados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas

6.4.16. Após esse período de incubação, retirar a estante com os tubos da incubadora, para efetuar a leitura dos resultados. Para isso, examinar os tubos sob luz negra em ambiente escuro considerando, como resultado positivo, a produção de pigmento fluorescente verde.

6.4.17. Transferir para outra estante os tubos com resultado positivo mantendo em fileiras seqüenciais os tubos positivos correspondentes a cada volume inoculado.

Nota: Essas culturas com resultado presuntivo positivo são encaminhadas ao ensaio para confirmação de *Pseudomonas aeruginosa* (item 6.4.21) imediatamente após leitura dos resultados

6.4.18. Registrar os resultados, anotando o número de tubos com resultado positivo para cada volume inoculado.

6.4.19. Retornar à incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ os tubos com resultados negativos, por um período adicional de 24 ± 1 hora.

6.4.20. Após esse período, efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), segundo descrito em 6.4.16, separando os tubos com resultado positivo (conforme especificado em 6.4.17) para realização dos ensaios para confirmação de *Pseudomonas aeruginosa* e descartando, agora, os tubos com resultados negativos.

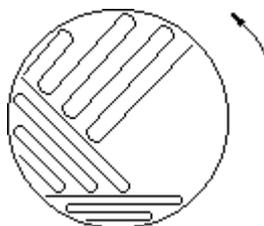
6.4.21. Com todas as culturas que apresentaram resultado presuntivo positivo em 24 ± 2 horas e 48 ± 3 horas, realizar os ensaios confirmativos, conforme descrito em 6.4.21.1 a 6.4.21.12, imediatamente após as respectivas leituras.

- 6.4.21.1. Marcar tubos de caldo acetamida correspondentes a cada tubo de caldo asparagina com resultado presuntivo positivo (produção de fluorescência verde).
- 6.4.21.2. Agitar bem cada tubo de caldo asparagina com resultado presuntivo positivo e, com uma pipeta estéril de 1mL, inocular 0,1mL no tubo de caldo acetamida correspondente.
- 6.4.21.3. Incubar todos os tubos de caldo acetamida inoculados durante 48 ± 3 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- 6.4.21.4. Efetuar a leitura após 48 ± 3 horas, considerando teste confirmativo positivo para *Pseudomonas aeruginosa* todos os tubos que apresentarem coloração púrpura (decorrente da alcalinização do meio). Descartar os tubos com resultados negativos.
- 6.4.21.5. Identificar placas de ágar leite correspondendo, cada uma, a um tubo de caldo acetamida com resultado positivo.
- 6.4.21.6. Flambar e resfriar uma alça de inoculação de platina ou níquel-cromo, com um aro de 3 mm de diâmetro em sua extremidade.
- 6.4.21.7. Agitar e inclinar o tubo de caldo acetamida e mergulhar a extremidade da alça de inoculação no líquido do tubo a uma profundidade de aproximadamente 1cm, para colher um inóculo da cultura.

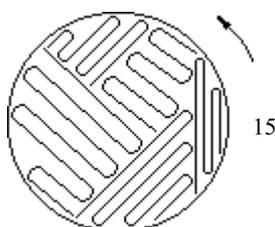
- a) Depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de ágar leite, girá-la e iniciar seu espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando rachá-lo:



- b) Girar novamente a placa e continuar o espalhamento no segundo quadrante:



- c) Proceder dessa maneira até completar a sementeira em toda a superfície do ágar.



- 6.4.21.8** Fechar e incubar a placa em posição invertida durante 48 ± 3 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- 6.4.21.9** Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura considerando como resultado positivo para *Pseudomonas aeruginosa* a ocorrência de colônias com halo (decorrente da hidrólise da caseína), que produziram um pigmento fluorescente verde difusível no meio.
- 6.4.21.10** Efetuar essa verificação em todas as placas de ágar leite correspondentes ao isolamento das culturas com resultados positivo em caldo acetamida e anotar os resultados.
- 6.4.21.11** Calcular o NMP a partir do número de tubos de caldo acetamida, cuja positividade foi comprovada por meio dos resultados obtidos em ágar leite.
- 6.4.21.12** A figura 3 mostra esquematicamente a seqüência do procedimento.

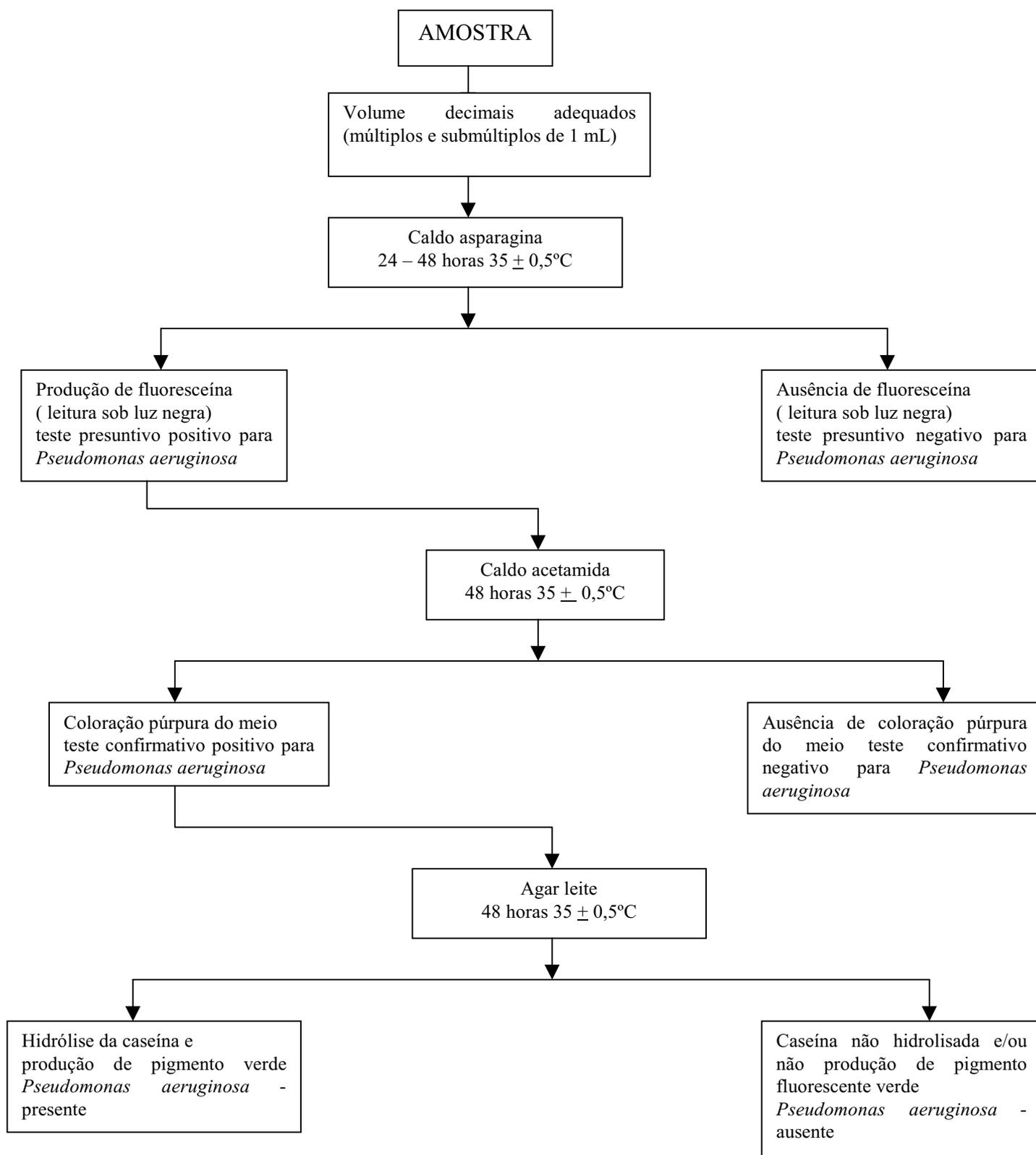


FIGURA 3 – Esquema do procedimento

7. Resultado

7.1 Cálculo do número mais provável (NMP)

7.1.1 A densidade de *Pseudomonas aeruginosa* é expressa como número mais provável por 100mL (NMP/100mL), por meio através de tabelas em que são apresentados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP.

7.1.2 A Tabela 1 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas cinco porções de 20mL da amostra.

TABELA 1 – Índice de NMP e limites de confiança de 95% quando são inoculadas cinco porções de 20mL da amostra

Nº de tubos que apresentam reação positiva, a partir de 5 tubos	Índice de N.M.P de 20mL por 100mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	>8,0	4,0	Infinito

7.1.3 A Tabela 2 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas dez porções de 10mL de amostra.

TABELA 2 – Índice de NMP e limite de confiança de 95%, quando são inoculadas dez porções de 10mL da amostra.

Número de tubos com reação positiva, a partir de dez tubos de 10mL	Índice de NMP/100mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	>23,0	13,5	Infinito

7.1.4 A Tabela 3 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas cinco porções de 10mL, cinco porções de 1 mL e cinco porções de 0,1mL da amostra. Embora os volumes indicados se refiram mais especificamente a amostras de águas pouco poluídas, esta tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de *Pseudomonas aeruginosa*, o código é composto a partir do número de tubos do meio caldo acetamida em relação aos quais a positividade dos resultados foi confirmada em ágar leite (hidrólise da caseína e produção de um pigmento esverdeado difusível nesse meio).

7.1.5 Utilização da Tabela 3

7.1.5.1 Quando são inoculadas apenas três séries de cinco tubos, sendo utilizados os volumes indicados na Tabela (10mL, 1mL e 0,1mL): nesse caso, o NMP é obtido diretamente a partir da Tabela 3. Para isso, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente.

TABELA 3 – Índice de NMP e limite de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10mL, 1mL e 0,1mL em série de cinco tubos.

Número de tubos com reação positiva quando utilizados, em série de cinco tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100mL	Limites de confiança de 95%	
10mL	1mL	0,1mL		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	29
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	-	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	2	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	≥1600	-	-

Considerem-se os exemplos que se seguem na Tabela 4, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

TABELA 4 – EXEMPLOS

Exemplos	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:			Código (combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100 mL
	10 mL	1 mL	0,1 mL		
1	5	2	0	520	50
2	4	2	0	420	22
3	5	5	1	551	300
4	5	5	5	555	>1600

Exemplos: ver Tabela 4

7.1.5.2. Quando são inoculadas apenas três séries de cinco tubos, sendo utilizados volumes decimais diferentes daqueles indicados na Tabela 3: Nesse caso procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor do NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

Considerem-se os seguintes exemplos da Tabela 5

TABELA 5 – Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:						Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	1 (10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL				
10-10 ⁻¹	5	4	0				540	130	$130 \times \frac{10}{10}$	130
10 ⁻¹ a 10 ⁻²		5	0	0	0		500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 ⁻¹ a 10 ⁻³			4	1	0		410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 ⁻² a 10 ⁻⁴				3	0	0	300	8	$8 \times \frac{10}{0,01}$	8000

7.1.5.3. Quando mais de três volumes decimais são inoculados: nesse caso, para a composição do código são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a três séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subseqüentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontrando-se o código na Tabela e o NMP a ele correspondente, o valor final do NMP é obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado selecionado para compor o código}}$$

Considerem-se os seguintes exemplos da Tabela 6.

TABELA 6 - Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:								Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	1 (10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL	10 ⁻⁶ mL				
10 a 10 ⁻²	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	-	-	-	-	531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1,1 x 10 ³
10 a 10 ⁻⁴	-	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	-	-	521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7,0 x 10 ³
10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	-	-	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	-	520	50	$50 \times \frac{10}{0,001}$	5,0 x 10 ⁵
10 ⁻² a 10 ⁻⁶	-	-	-	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 ⁵

Obs: Números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

7.1.5.4. Casos Especiais

- Se menos que três das diluições inoculadas apresentarem resultados positivos para a composição do código serão selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver Exemplo 1 da Tabela 7)
- Se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao número de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver Exemplo 2 da Tabela 7)
- Embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes do código, se isso ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultado positivo correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver Exemplo 3 da Tabela 7)
- Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar, para a composição do código, as três maiores diluições (ver Exemplo 4 da Tabela 7)
- Se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar para a formação do código, as três menores diluições (ver Exemplo 5 da Tabela 7).

TABELA 7 - Exemplos

Exemplos	Volumes decimais inoculados (mL)	Número de tubos dos resultados positivos em cada série de cinco tubos inoculados com:							Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP /100mL
		10 mL	1(10 ⁰) mL	1(10 ⁻¹) mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL				
1	10 ⁰ – 10 ⁻³		<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0			410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	170
2	10 ⁰ – 10 ⁻⁵		5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	2,2 x 10 ⁴
3	10 – 10 ⁻⁴	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	0		540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	1,3 x 10 ³
4	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁵			5	5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	555	≥ 1600	$>1600 \times \frac{10}{0,001}$	≥ 1,6 x 10 ⁷
5	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁵			<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	000	< 2	$<2 \times \frac{10}{0,1}$	< 200

7.2 Expressão dos Resultados

7.2.1. Os resultados são expressos como:

NMP/100 mL de *Pseudomonas aeruginosa*

8. Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Microbiological examination. In: Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20^a ed. Washington. APHA, AWWA, WEF, 1998, p. 9 – 31.

BLACK, A.P.; KEIRN, M.A.; SMITH J.J.; DYKES, G.M. & HARLAN, W.E. **The disinfection of swimming pool water** – Part II, A field study of the disinfection of public swimming pools, *American Journal of Public Health*, 60: 740-750, 1970.

BOBO, R.A. ; NEWTON, E.J.; JONES , L.F.; FARMER, L.H.; FARMER, J.J. **Nursery outbreak of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological conclusions from five different methods.** *Applied Microbiology*. **25** (3): 414-420, 1973.

BRODSKY, M.H. & NIXON, M.C. **Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey agar under ultraviolet light.** *Applied Microbiology*, **26** (2): 219-220, 1973.

BROWN, M.R.W. & SCOTT FOSTER, J.H. **A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Clinical Pathology*, 23: 172-177, 1970.

BROWM, V.I. & LOWBURY, E.J.L. **Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Clinical Pathology*, 18 (6): 725-756, 1965.

BURTON, M.A.; CAMPBELL, J.J.R. & EAGLES, B.A. **The mineral requirements for pyocyanine production.** *Canadian Journal of Research*, 26: 15-22, 1948.

BUTTIAUX R. **L'analyse bactériologique des eaux de consommation.** Editions Médicales Flammarion, Paris, 1951.

CABELLI, V.J **Swimming-associated illness and recreational water quality criteria**, *Wat. Sci. Tech.*, 21(2): 13-21.

CARRUTHERS, M.M. & KANOKVECHAYANT, R. ***Pseudomonas aeruginosa* endocarditis.** *The American Journal of Medicine*, 55: 811-818, 1973.

CARSON, L.A.: PETERSEN, N.J. ; FAVERO, M.S.; DOTO, I.L.; COLLINS, D.E.C & LEVIN, M.A. **Factors influencing detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by most-probable-number and membrane filtration techniques.** *Applied Microbiology*, 30 (6) : 935-942, 1975.

CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água.** CETESB, São Paulo, 1988.

CETESB. **Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água.** São Paulo, 1989 Norma Técnica L5.010.

CETESB. **Controle de qualidade de meios de cultura.** São Paulo, 1987 Norma Técnica L5.216.

CETESB. **Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.** São Paulo, 1986 Norma Técnica M1.001.

COTHRAN. W.W. & HATLEN. J.B. **A study of an outdoor swimming pool using iodine for water disinfection.** *Student medicine*, 10: 439-502, 1962.

DRAKE. C.H. **Evaluation of culture media for isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Health Laboratory Science*, 3 (1) : 10-19, 1966.

DUNCAN. I.B.R. & BOOTH, E.V. **Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections investigated by pyocin typing.** *CMA Journal*, 112: 837-843, 1975.

DUTKA. B.J. **Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments.** Canada , Centre for Inland waters. Burlington, Ontario, 1978.

FAVERO. M.S.; CARSON, L.A.; BOND, W.W. & PETERSEN. N.J. ***Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals.** *Science*, 173: 836-838, 1971.

FITSGERALD. G.P.; DerVARTANIAN, M.E. ***Pseudomonas aeruginosa* for the evaluation of swimming pool chlorination and algicides.** *Applied Microbiology*, 17: 415-421, 1969.

GRANT. M.A. & HOLT, J.G. **Medium for the selective isolation of members of the genus *Pseudomonas* from natural habitats** *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (5): 1222-1214, 1977.

HART, A. & KITE, P.E. **Comparison of four selective agars for the isolation of *Pseudomonas*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (5): 1209-1214, 1977.

HAYNES, W.C. ***Pseudomonas aeruginosa* – its characterization and identification.** *Journal of General Microbiology*, 5: 939-950, 1951.

HIGHSMITH, A.K. & ABSHIRE, R. L. **Evaluation of a most-probable-number technique for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Applied Microbiology*, 30 (4): 596-601, 1975.

HOADLEY, A.W. **On the significance of *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters.** *Journal of the New England Water Works Association*, 82 (2) : 99-111. 1988.

HOADLEY, A.W. & AJELLO, G.W. **Some characteristics of fluorescent *Pseudomonas* isolated from surface waters and capable of growth at 41°C.** *Canadian Journal of Microbiology*, 18 (11): 1769-1773. 1972.

HUNTER, C.A. & ENSIGN, P.R. **An epidemic of diarrhea in a new-born nursery caused by *Pseudomonas aeruginosa*.** *American Journal of Public Health*, 37: 1166-1169, 1947.

KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. **Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein,** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44 (2): 301-307, 1954.

LANTOS, J.: KISS, M.: LANYI, B. & VOLGYESI, J. **Serological and phage typing of *Pseudomonas aeruginosa* invading a municipal water supply.** *Acta Microbiologica Academiae Scientia Hungaricae*, 16: 333-336, 1969.

LILLY, H.A. & LOWBURY, E.J.L. **Cetrimide-nalidixic acid agar as selective for *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Medical Microbiology*, 5: 151-153, 1972.

NEMÉDI, L. & LANYI, B. **Incidence and hygienic importance of *Pseudomonas aeruginosa* in water.** *Acta Microbiologica Academiae Scientia Hungaricae*, 18: 319-326, 1971.

REITLER, R. & SELIGMAN, R. ***Pseudomonas aeruginosa* in drinking water.** *Journal of Applied Bacteriology*, 20 (2): 145-150, 1957.

SENTURIA, B.H. **Etiology of external otitis.** *Laryngoscope*, 55: 277-293, 1945.

SEYFRIED, P.L. & FRASER, J.D. ***Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools related to the incidence of otitis externa infection.** *Health Lab. Sci.*, 15 (1): 51-56, 1977.

SHIGETA, S. & ISHIDA, N. **Studies of *Pseudomonas aeruginosa* infections among hospitalized patients.** *Japanese Journal of Microbiology*, 18 (1): 9-14, 1974.

STIERITZ, D.D. & HOLDER, I.A. **Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description of a burned mouse model.** *The Journal of Infectious Diseases*, 131 (6): 688-691, 1975.

TAYLOR, E.W. **The examination of water and water supplies.** 6 ed. Little Brown and Co. Boston, Massachusetts, 1958.

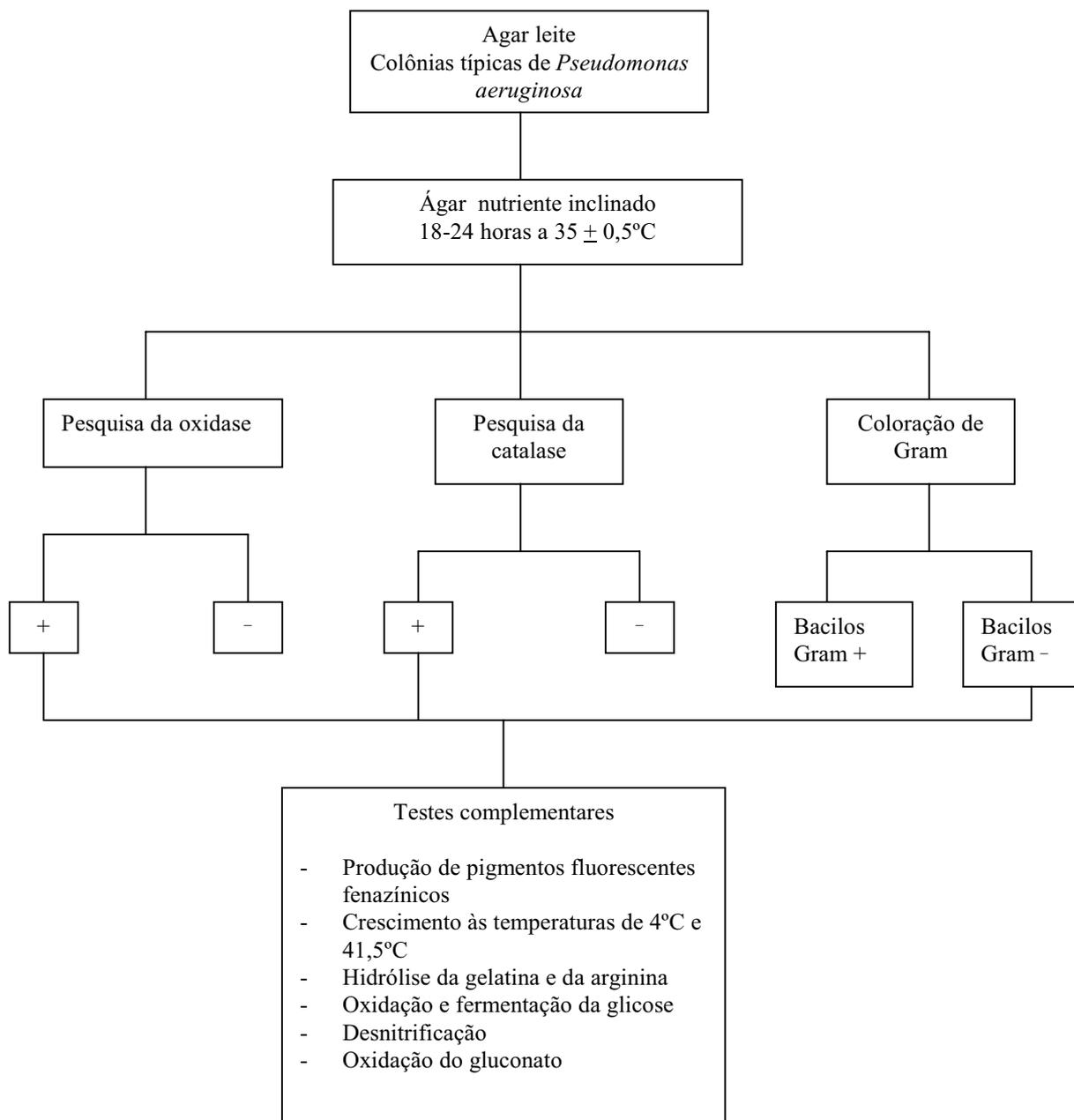
THORNLEY, M.J. **The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism.** *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 37-52, 1960.

WEINGARTEN, A.M. **Otitis externa due to *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pool bathers.** *Journal of the Royal College of General Practitioners*, 27: 359-360, 1977.

.../Anexo A

ANEXO A – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Devido à possibilidade de ocorrência de resultados falso – positivos no procedimento de enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de tubos múltiplos, é recomendável que, periodicamente, seja efetuada a caracterização bioquímica de um número significativo de colônias isoladas a partir do ensaio de confirmação em ágar leite, para avaliar a eficiência da técnica. Para essa finalidade, é recomendada a seguinte seqüência de testes:



O procedimento para a realização desses testes é descrito de A – 1 até A – 4.

A –1 Selecionar de cada placa de ágar leite, três colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* e, utilizando uma alça de inoculação flambada e resfriada, transferir cada uma delas para um tubo contendo ágar nutriente inclinado.

A – 2 Incubar os tubos de ágar nutriente inoculados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

A – 3 A partir das culturas de 18 a 24 horas em agar nutriente, realizar os testes de A-3 a A-3.12.

A – 3 .1. Pesquisa da oxidase: com uma alça de inoculação de platina, devidamente flambada e resfriada retirar uma pequena quantidade do crescimento em ágar nutriente e tocar uma folha de papel de filtro, previamente colocada no fundo de uma placa de Petri estéril e embebida em solução de cloridrato de N-N-N'-N'-tetrametil-p-fenilenodiamina. A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul intensa, em aproximadamente 30 segundos, no local em que foi depositada a cultura. Se nenhuma ou discreta reação se desenvolver no período de dois minutos de observação, considera-se como prova negativa. Para a realização do teste, usar sempre como controles, uma cultura oxidase-positiva (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*) e uma cultura oxidase-negativa (*Escherichia coli*).

A-3.2. Pesquisa da catalase: com uma alça de inoculação, transferir uma pequena quantidade do crescimento em agar nutriente para uma lâmina de vidro e sobre ela adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas constitui resultado positivo para catalase, indicando provável presença de *Pseudomonas aeruginosa*. A ausência de bolhas constitui resultado negativo para catalase, indicando a presença de outras espécies de bactérias. Para a realização do teste, usar sempre, como controles, uma cultura catalase-positiva (*Pseudomonas aeruginosa*) e uma cultura catalase-negativa (*Streptococcus faecalis*).

A-3.3. Coloração de Gram: a partir de cada cultura de 18 a 24 horas em ágar nutriente, preparar um esfregaço e corá-lo pelo método de Gram, como segue:

- a) limpar bem uma lâmina de vidro para livrá-la de qualquer traço de película oleosa;
- b) colocar uma gota de água de diluição sobre a lâmina;
- c) com uma alça de inoculação, colher uma pequena quantidade de crescimento bacteriano na superfície do agar inclinado e suspendê-la na gota de água de diluição;
- d) com a ponta da alça de inoculação, espalhar sobre a lâmina de modo a formar uma película bem fina;
- e) fixar o esfregaço passando a lâmina três vezes sobre a chama;
- f) cobrir o esfregaço durante um minuto com solução de cristal violeta;
- g) remover o excesso da solução de cristal violeta da lâmina lavando-a levemente com água corrente;
- h) cobrir o esfregaço com solução de lugol durante um minuto;
- i) decolorar o esfregaço, usando uma solução de álcool-acetona (1:1);
- j) cobrir o esfregaço, durante 15 segundos, com solução de safranina diluída;
- k) lavar a lâmina em água corrente e enxugá-la delicadamente com papel de filtro, por meio de leve compressão sobre a lâmina.

Examinar as lâminas ao microscópio usando objetiva de imersão. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se nessa coloração, como bacilos Gram-negativos (corados em rosa), podendo ocorrer isolados, aos pares, ou, raramente, em cadeias curtas.

A-3.4. Dar seqüência aos testes com as culturas que apresentarem resultado positivo nos testes para pesquisa da oxidase e catalase e que forem identificadas como bacilos Gram-negativos Descartar as demais.

A-3.5. Para verificação da produção de fluoresceína, proceder da seguinte forma:

- a) com uma agulha de inoculação devidamente flambada e esfriada, retirar um inóculo da cultura de 18 a 24 horas em ágar nutriente, transferindo-o para um tubo contendo o meio B de King;
- b) inoculação é feita por picada central até o fundo da coluna do meio sólido, espalhando-se em estrias o restante do inóculo na sua superfície inclinada;
- c) incubar à temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas;
- d) efetuar a leitura sob luz negra, considerando
 - presença de fluoresceína: prova positiva
 - ausência de fluoresceína: prova negativa

A-3.6. Para a verificação da produção de pigmentos fenazínicos proceder da seguinte forma:

- a) com uma agulha de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento em ágar nutriente de 18 a 24 horas e inocular, segundo o mesmo processo descrito no item A-3.5. A transferência do inóculo é feita para um tubo contendo meio A de King
- b) a prova positiva é dada pela produção de pigmentos no meio, cuja coloração pode variar de
 - azul claro a azul escuro (para culturas que produzem predominantemente piocianina)
 - rosa claro a marrom escuro (para culturas que produzem predominantemente piorrubina); e
 - matizes e misturas de vermelho e marrom (para culturas que produzem ambos os pigmentos).
- c) a prova negativa é dada pela ausência de pigmento no meio.

Nota: Embora o meio A de King apresente componentes que inibem a produção de fluoresceína, pequenas quantidades desse pigmento podem ser produzidas por algumas culturas de *Pseudomonas aeruginosa*, conferindo ao meio uma coloração esverdeada.

A-3.7. Teste para verificar o crescimento em diferentes temperaturas (4°C e $41, 5^{\circ}\text{C}$): com uma agulha de inoculação devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento de 18 a 24 horas em ágar nutriente e inocular em dois tubos contendo ágar nutriente. Incubar um dos tubos inoculados a 4°C e o outro a $41,5^{\circ}\text{C}$. Efetuar a leitura após 24 horas de inoculação.

Considerando:

- a) ausência de crescimento: prova negativa
- b) presença de crescimento: prova positiva

A-3.8. Teste para pesquisa de gelatinase: com uma agulha de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento de 18 a 24 horas em ágar nutriente e inocular em um tubo com o meio gelatina nutriente. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas e após esse período, deixar em geladeira durante dez minutos. Efetuar a leitura considerando:

- a) não liquefação da gelatina: prova negativa
- b) liquefação da gelatina: prova positiva

A-3.9. Teste da oxidação-fermentação (OF) da glicose, segundo Hugh & Leifson

Inocula-se, para cada cultura em teste, 2 tubos contendo o meio de Hugh & Leifson, com glicose. Um tubo será utilizado para o teste de fermentação e o outro para o teste de oxidação.

Para o teste de fermentação o tubo contendo o meio de Hugh & Leifson, com glicose será previamente aquecido em banho-maria durante aproximadamente dez minutos, para remover o oxigênio existente em seu interior e resfriado rapidamente antes do uso. Inocular os respectivos tubos para os testes de fermentação e oxidação, pelo procedimento de picada em profundidade. No tubo referente ao teste de fermentação, logo após a inoculação, acrescentar algumas gotas de vaselina líquida estéril, a fim de formar uma camada de aproximadamente 5mm sobre a superfície do meio. Incubar a 35°C e observar durante cinco dias.

Tanto a oxidação como a fermentação da glicose são evidenciadas pela viragem do indicador de verde para amarelo em decorrência da acidificação do meio. Efetuar a leitura para cada um dos dois tubos inoculados:

- a) coloração verde: prova negativa
- b) coloração amarela: prova positiva

No metabolismo fermentativo, ambos os tubos apresentarão coloração amarela, ao passo que no metabolismo oxidativo, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, apenas o tubo sem adição de vaselina (apresentando, portanto, condições de aerobiose) apresentará a coloração amarela na parte mais superficial do meio de cultura.

A – 3. 10 Teste para verificar a hidrólise da arginina: com uma agulha de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento de 18 a 24 horas em ágar nutriente e inocular em dois tubos contendo o meio de Thornley. Logo após a inoculação, acrescentar em um dos tubos algumas gotas de óleo mineral estéril, a fim de formar uma camada de 5mm na superfície. Incubar os dois a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. A atividade da arginina dehidrolase é evidenciada pela viragem do indicador. Efetuar a leitura considerando:

- a) coloração rosa: prova negativa
- b) coloração vermelha: prova positiva

A – 3. 11 Teste para verificar a desnitrificação do nitrato: com uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir um inóculo do crescimento de 18 a 24 horas em ágar nutriente para um tubo contendo caldo nitrato. Incubar em estufa a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e efetuar a leitura após 24 horas.

- a) presença de gás no tubo de Durham: prova positiva

b) ausência de gás no tubo de Durham: prova negativa

A – 3.12 Teste para verificar a oxidação do gluconato: com uma agulha de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar o material da cultura de 18 a 24 horas em meio de ágar nutriente e inocular no tubo contendo caldo gluconato. Incubar em estufa a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 48 horas. Após o período de incubação, adicionar 1,0mL do reativo de Benedict às culturas que cresceram bem, colocando-as em banho-maria fervente durante dez minutos. Efetuar a leitura considerando:

- a) presença de precipitado vermelho: prova positiva
 b) ausência de precipitado vermelho: prova negativa

As culturas que não apresentarem bom desenvolvimento a 35°C após 48 horas devem ser deixadas à temperatura ambiente durante 48 horas adicionais. Após esse período, adicionar 1,0mL do reativo de Benedict às culturas, colocá-las em banho-maria fervente durante dez minutos e considerar os resultados como descritos acima.

A – 4 As culturas de *Pseudomonas aeruginosa*, nas provas bioquímicas complementares, devem apresentar os resultados da Tabela 8.

TABELA 8 – Resultados de *Pseudomonas aeruginosa* nas provas bioquímicas complementares

Pigmento	fluoresceína	+
	fenazina	+
Crescimento a 4°C		-
Crescimento a $41,5^\circ\text{C}$		+
Hidrólise da gelatina		+
OF	Oxidação	+
	Fermentação	-
Arginina	Aerobiose	+
	Anaerobiose	+
Produção de gás N_2		+
Oxidação do gluconato		+

.../Anexo B

ANEXO B – RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

B –1 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma Técnicas CETESB M1.001 – Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia.

B – 2 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade por meio da realização de ensaios específicos.

B – 5 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes para avaliação e controle dos meios de cultura a serem empregados no ensaio para determinação do NMP de *Pseudomonas aeruginosa*. Ver Norma Técnica CETESB L5.216 – Controle de qualidade de meios de culturas.
