



NORMA TÉCNICA

L5.223

3ª Edição
Abril/2011
17 páginas

***Pseudomonas aeruginosa* - Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante: Método de ensaio**

Pseudomonas aeruginosa in water by membrane filtration technique: Method of assay

Prescreve o método para quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de membrana filtrante, utilizado para: avaliação da qualidade de águas minerais; avaliação da qualidade de águas destinadas ao abastecimento público; avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas.

Pseudomonas aeruginosa, Análise bacteriológica,
Análise da água, Água de consumo humano

Pseudomonas aeruginosa, Bacteriological
analysis, Water analysis, Drinking water

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>

Primeira Edição

Dezembro/1985, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D.. n. 006/86/DENG, de 20/08/86.

Errata

Dezembro /1985, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D.. n. 013/87/DTQA, de 29/10/87.

Segunda Edição

Mai/1993, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D.. n. 045/93/N, de 11/11/93.

Terceira Edição

Abril/2011, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D.. n. 238/11/E, de 23/08/11. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.121, n. 162, de 26/08/11, Poder Executivo, Seção I, p. 28 a 31.

Sumário

1.	Introdução	2
2.	Escopo	3
3.	Documentos complementares	3
4.	Materiais	3
5.	Meios de cultura e soluções	6
6.	Execução do ensaio	9
7.	Resultado.....	14
8.	Referências bibliográficas	16

1. Introdução

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria de origem ambiental, com necessidades nutricionais mínimas para crescimento e capacidade para adaptar-se a várias condições adversas, podendo sobreviver não somente em solo e água, mas também em outros ambientes desfavoráveis (HARDALO & EDBERG, 1997). É frequentemente encontrada no esgoto, em águas superficiais (rios e lagos) e raramente em água de consumo humano (MENA & GERBA 2009).

Trata-se de um bacilo aeróbico, Gram-negativo, com um flagelo polar, pertence à família Pseudomonadaceae. Em meios adequados produz a piocianina, pigmento de cor azul, e algumas linhagens também produzem a pioverdina, pigmento verde fluorescente. Similarmente a outras pseudomonas fluorescentes, *P. aeruginosa* produz catalase e amônia a partir de arginina (BRENNER et al., 2005). Seu metabolismo é respiratório, mas pode crescer na ausência de oxigênio, se nitrato for disponível (TODAR'S, 2011).

Pode ser patogênica para plantas, e para humanos é um típico patogênico oportunista, causando uma grande variedade de infecções. Vários estudos epidemiológicos relatam sua ocorrência em ambientes hospitalares e comprovam a resistência aos antibióticos em linhagens isoladas de material clínico (WHO 2004; TODAR'S 2011). Nesses ambientes, *P. aeruginosa* é a principal causa de infecções em lesões provenientes de queimaduras e causa frequente de infecções respiratórias e bacteremias (MENA & GERBA 2009). Nos Estados Unidos, 20% de todas as pneumonias hospitalares são causadas por *P. aeruginosa* que estão frequentemente associadas à água de abastecimento (ANAISSIE et al. 2002). Devido às suas necessidades nutricionais mínimas, pode crescer na rede de abastecimento de

água e em materiais utilizados em encanamentos domésticos (LIGHTFOOT 2003). Espécies de *Pseudomonas*, incluindo *P. aeruginosa* são componentes de biofilmes, que podem ser formados em próteses e outros dispositivos médicos permanentes, filtros e sistemas de encanamento de água (DONLAN 2002). GELEDREICH (1996) discute a ocorrência da *P. aeruginosa* em amostras ambientais: no esgoto, que podem conter uma mistura de efluentes domésticos, industriais e escoamento de águas pluviais, 90% das amostras podem ser positivas. Em águas superficiais receptoras dessas fontes de poluentes as densidades da bactéria podem variar de 1 a 10.000 células por 100 mL.

Pode igualmente colonizar piscinas de termas e banheiras de água quente, e nesses casos a origem predominante é o próprio usuário, mas o ambiente adjacente também pode ser fonte de contaminação. O ambiente quente e úmido proporcionado pelos deques, ralos e pisos das piscinas termais e locais similares favorece o crescimento de *Pseudomonas*. (WHO 2006). Nesses ambientes, onde as principais vias de exposição são o contato com pele e mucosas, são mais comuns as infecções dermatológicas e a otite (WHO 2004, 2006), sendo essa bactéria a causa predominante de surtos dessas infecções (CRAUN et al. 2005)

A legislação brasileira adota *Pseudomonas aeruginosa* como critério de qualidade para águas minerais e naturais engarrafadas (BRASIL 2005), requerendo ausência da bactéria em amostra indicativa e, no máximo, uma unidade de amostra com densidades variáveis entre 1 e 2 NMP (número mais provável) ou UFC (unidade formadora de colônia) em 100 mL de água para amostras representativas (cinco unidades). A comunidade européia também determina a ausência da bactéria em 250 mL de águas engarrafadas (European Union 1998).

Além disso, a pesquisa dessa bactéria em piscinas é recomendada em Norma da ABNT NBR 10818/1989 (ABNT 1989) quando da ocorrência de epidemias. A determinação de *Pseudomonas* sp em piscinas internas ou externas submetidas a processos de desinfecção é recomendada igualmente no "Standard Methods" (APHA 2007).

Esta Norma descreve o método de determinação de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de membrana filtrante com o meio mPA-B, segundo DUTKA e KWAN (1977).

2. Escopo

Esta Norma prescreve o método para a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de membrana filtrante, com aplicação na:

- a) avaliação da qualidade de águas minerais e águas naturais engarrafadas;
- b) avaliação da qualidade de águas destinadas ao abastecimento público;
- c) avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas.

3. Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma sugere-se consultar:

- Controle e garantia da qualidade nas análises microbiológicas de águas para consumo humano. Procedimentos e critérios. CETESB 2007.
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. CETESB. 1988.

4. Materiais

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com 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.

4.1.2 Destilador ou purificador de água

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (CETESB 2007).

4.1.3 Equipamentos para esterilização

4.1.3.1 Autoclave

Deve ter a 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.

Nota: 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.

4.1.3.2 Estufa 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 o seu bulbo colocado na areia, durante o uso.

4.1.4 Equipamentos para filtração

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

4.1.4.2 Frasco Kitassato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada (usualmente 4 L) ou suporte para os porta-filtros individual ou múltiplo.

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

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

4.1.4.5 Incubadora bacteriológica (41,5° C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida (41,5 ± 0,5° C). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a escala graduada em incrementos de 0,5° C ou menos e estar imerso em líquido.

4.1.4.6 Incubadora bacteriológica (35° C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida (35 ± 0,5° C). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a escala graduada em incrementos de 0,5° C ou menos e estar imerso em líquido.

4.1.4.7 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua padronização deve ser feita antes de cada período de uso com duas soluções-tampão padrões, de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada. (Exemplo: pH = 6,86 e pH = 4,0 ou pH = 9,18)

4.1.4.8 Microscópio estereoscópico binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros. Para iluminação, usar lâmpada de luz fluorescente branca (fria).



FONTE: CETESB

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

4.1.4.9 Refrigerador

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

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Balões

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

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

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

4.2.3 Provetas

De vidro borossilicato neutro, graduadas (100mL) ou porta filtros-graduados com marcação externa com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4 Frasco para água de diluição

De vidro borossilicato neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas, 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.

4.2.5 Pipetas

Tipo Mohr, para 10mL, 5mL, 2mL e 1mL com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis de plástico, estéreis, ou de vidro borossilicato neutro.

4.2.6 Placas de Petri

De vidro borossilicato neutro de boa qualidade, com 15mm de altura e 100mm de diâmetro ou de plástico não tóxico com 15mm de altura e 90mm de diâmetro.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, de platina-irídio ou de platina, com 0,5mm de diâmetro e 7- 8cm de comprimento, com uma alça de 3mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

Nota: Opcionalmente podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro. Antes do uso, estas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante 2 horas. Após o uso as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 30 minutos e descartadas.

4.3.2 Suportes para incubação

Podem ser estantes ou bandejas forradas com material absorvente embebido em água, para fornecer a umidade requerida durante a incubação das placas de Petri contendo as membranas após a filtração das amostras.

4.3.3 Bicos de Bunsen ou similar

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

4.3.4 Caixas ou cestas de aço inoxidável.

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.5 Membranas filtrantes

De acetato de celulose ou mistura de acetato de celulose e nitrato de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas, estéreis.

4.3.6 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.7 Placas de Petri para membrana filtrante

De plástico não tóxico, estéreis, bem vedadas, de 49mm de diâmetro por 13mm de altura.

4.3.8 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro borossilicato neutro ou de aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.3.9 Termômetros

Os termômetros devem ter escala, sensibilidade e exatidão adequada ao uso. Quando possível, deve dar-se preferência à utilização de termômetros digitais, em substituição aos termômetros de mercúrio.

5. Meios de cultura e soluções

Nota: Para o preparo dos meios de cultura devem ser usados meios desidratados de qualidade comprovada.

5.1 Meio mPA-B

5.1.1 Fórmula

Cloridrato de L-lisina	5,00g
Cloroeto de sódio (NaCl).	5,00g

Extrato de levedura	2,00g
Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃).....	5,00g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	1,50g
Sacarose	1,25g
Xilose	1,25g
Lactose	1,25g
Vermelho de fenol	0,08g
Citrato férrico amoniacal	0,80g
Ágar	15,00g
Água purificada.....	1000mL

pH final após esterilização: 7,1 ± 0,2

Nota: Este meio de cultura é disponível comercialmente, na forma desidratada, sob a denominação mPA-C. O meio mPA-B é obtido com a adição dos componentes listados abaixo

5.1.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades recomendadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria até a completa dissolução dos ingredientes. Ajustar o pH para 6,5. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 45-50°C, em banho-maria, reajustar o pH para 7,1 ± 0,2 e adicionar as seguintes substâncias (para cada litro do meio preparado):

Sulfapiridina	176,0mg
Sulfato de canamicina	8,5mg
Ácido nalidíxico	37,0mg
Ciclohexamida.....	150,0mg

Misturar bem e distribuir volumes de aproximadamente 4mL em placas de Petri de plástico de 49mm x 13mm e deixar solidificar.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, ao abrigo da luz, durante no máximo, um mês.

5.2 Ágar leite

5.2.1 Fórmula

Solução nº 1.....	500mL
Solução nº 2.....	500mL

5.2.2 Preparo

Este meio deve ser preparado como segue:

a) preparar a solução nº 1, com a seguinte composição:

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

Pesar 100g de leite em pó desnatado e acrescentar uma pequena quantidade de água purificada fria. Misturar bem até que uma pasta homogênea seja obtida. Adicionar a essa pasta o restante da água purificada. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 106°C durante 10-15 minutos. Após a esterilização, manter a solução preparada em banho-maria a uma

temperatura de 50-55°C, para estabilização da temperatura, até o momento de sua adição à solução nº 2.

b) preparar a solução nº 2, com a seguinte composição:

Caldo nutriente:.....12,5g

Cloreto de sódio (NaCl):.....2,5g

Ágar.....15,0g

Água purificada.....500mL

Pesar o meio Caldo Nutriente desidratado, nas quantidades recomendadas pelo fabricante e os outros reagentes e acrescentar 500mL de água purificada 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. Após a esterilização, colocar em banho-maria a uma temperatura de 50-55°C para estabilização da temperatura do meio de cultura preparado.

c) juntar as soluções nº 1 e nº 2 e, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 20mL em placas de Petri de 15mm x 100mm (vidro) ou 15mm x 90mm (plástico), previamente esterilizadas.

5.2.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, durante, no máximo, duas semanas.

5.3 Água de diluição

5.3.1 Fórmula

Solução-estoque A1,25mL

Solução-estoque B5,00mL

Água purificada1000mL

5.3.2 Preparo

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

Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄)34g

Água purificada1000mL

Dissolver o dihidrogenofosfato de potássio em 500mL de água purificada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,5 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000 mL com água purificada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração, durante no máximo dois meses.

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

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

Cloreto de magnésio (MgCl₂ . 6H₂O) 81,1g

Água purificada1000mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água purificada e completar o volume para 1000mL com água purificada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração, durante no máximo dois meses.

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

d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de $90 \pm 2\text{mL}$;

e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

Nota: A água de diluição a ser utilizada no enxágue de porta-filtros, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização em autoclave do volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 e 1000mL).

5.3.3 Armazenamento

A solução preparada poderá ser estocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas.

5.4 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.4.1 Fórmula

Hidróxido de sódio (NaOH)40g

Água purificada1000mL

5.4.2 Preparo

Pesar 40g de hidróxido de sódio e dissolver em 1000mL de água purificada.

5.4.3 Armazenamento

Em frasco com tampa de rosca âmbar ou protegido da luz, à temperatura ambiente, durante no máximo seis meses.

6. Execução do ensaio

6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para quantificação de *P. aeruginosa* baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante, com porosidade de $0,45\mu\text{m}$. Essas bactérias, apresentando dimensões maiores que os poros da membrana, ficarão retidas em sua superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial (Ágar mPA-B). Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período determinado de incubação (96h a $41,5^\circ\text{C}$) desenvolvem-se colônias com características típicas (achatadas, com diâmetro de aproximadamente 0,8 a 2,2mm, núcleo central marrom-escuro ou preto-esverdeado e as bordas claras), que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A partir da confirmação dessas colônias em ágar leite, para verificação da hidrólise da caseína e produção de pigmento amarelado a verde difusível no meio, calcula-se a densidade de *P. aeruginosa* na amostra analisada.

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

a) para águas destinadas ao consumo humano, é requerida a análise de um volume mínimo de 100mL da amostra, o qual é filtrado diretamente, no caso de águas de boa qualidade, ou subdividido em volumes menores, dependendo do grau de contaminação que pode estar presente.

b) para outros tipos de água, incluindo águas superficiais marinhas ou doces, pode ser requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra), dependendo do grau de contaminação presente.

6.3.2 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando como desinfetante álcool etílico 70%.

6.3.3 Dispor sobre a mesma o seguinte material:

- a) porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao suporte de filtração (manifold ou a um suporte especial), o qual é conectado a um frasco Kitassato, que por sua vez é conectado a um frasco Kitassato de proteção e este à fonte de vácuo;
- b) placas de Petri, de 49x13mm, contendo o meio mPA-B, identificadas com os números das amostras e o volume a ser filtrado;
- c) pinça com as extremidades mergulhadas em álcool etílico contido em um béquer;
- d) bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;
- e) provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra. Podem ser utilizados porta-filtros graduados com marcação externa, desde que os mesmos apresentem erro volumétrico inferior a 2,5%.
- f) água de diluição estéril, contida em balões, erlenmeyers ou frascos de polipropileno de 1000mL; e
- g) membranas filtrantes de acetato de celulose ou de acetato de celulose e nitrato de celulose estéreis, com 47mm de diâmetro e porosidade de 0.45µm, brancas e quadriculadas.

6.3. Preparação do porta-filtro

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com as extremidades de uma pinça previamente flambadas e resfriadas, colocar uma membrana filtrante estéril sobre a parte inferior do porta-filtro;
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana.
- c) para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição estéril no início de cada série de filtração e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para filtração

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 10mL:

- a) homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço; e
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas, ou então em porta-filtro com graduação, e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.5.2 Para volumes inferiores a 10mL

- a) homogeneizar a amostra como descrito em **6.3.5.1.a** e, com o auxílio de uma pipeta estéril retirar o volume desejado e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração);
- b) homogeneizar e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação

6.3.6.1 Verter cuidadosamente no porta-filtro o volume da amostra a ser examinado, evitando que a água respingue sobre as suas bordas superiores.

6.3.6.2 Ligar o sistema ou a bomba de vácuo e proceder à filtração.

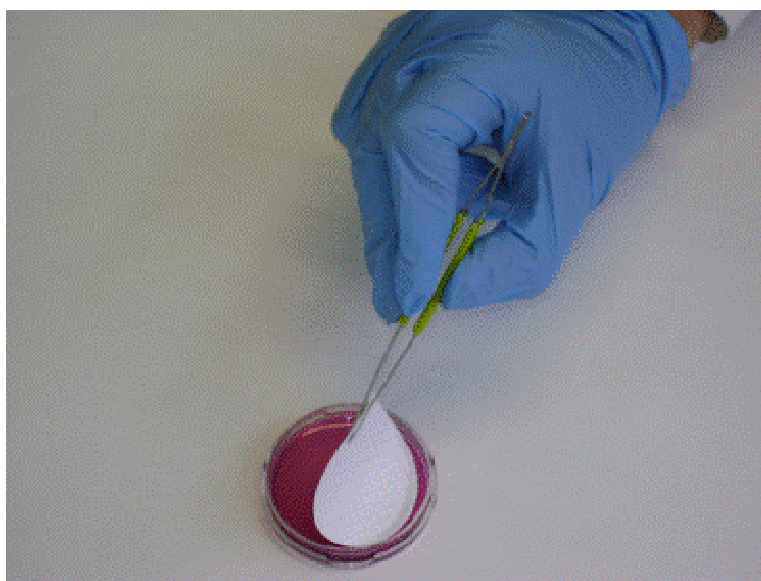
6.3.6.3 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro três vezes, com porções de 20-30mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

6.3.6.4 Desligar a válvula de controle de vácuo do porta-filtro, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante, desligando o vácuo imediatamente após o término do processo de filtração.

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

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

Observação: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar com ela um movimento giratório para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, sempre com a extremidade da pinça flambada e resfriada, levantar a borda da membrana mais próxima da bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo, o seu crescimento (**ver figura 2**).



FONTE: CETESB

FIGURA 2- Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

6.3.6.7 Tampar a placa de Petri.

6.3.6.8 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril e proceder à filtração da próxima amostra.

Nota: Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtração e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os mesmos devem ser esterilizados novamente ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental

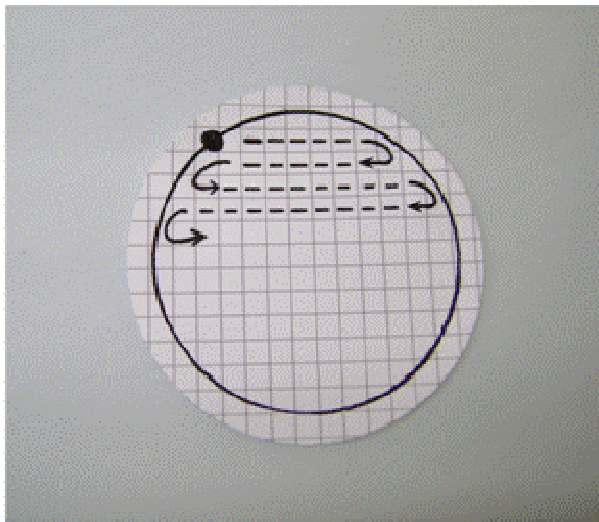
6.3.6.9 Após as filtrações, colocar as placas de Petri contendo o meio de cultura e a membrana, em posição invertida, em bandejas ou estantes nos quais foram colocadas folhas de papel toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água e incubar as placas a $41, 5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 96 horas.

6.3.7 Leitura

6.3.7.1 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa*. No meio mPA- B, essas colônias se apresentam com um núcleo central marron-escuro ou preto-esverdeado, com as bordas claras; são achatadas e seu diâmetro é de aproximadamente 0,8 a 2,2mm.

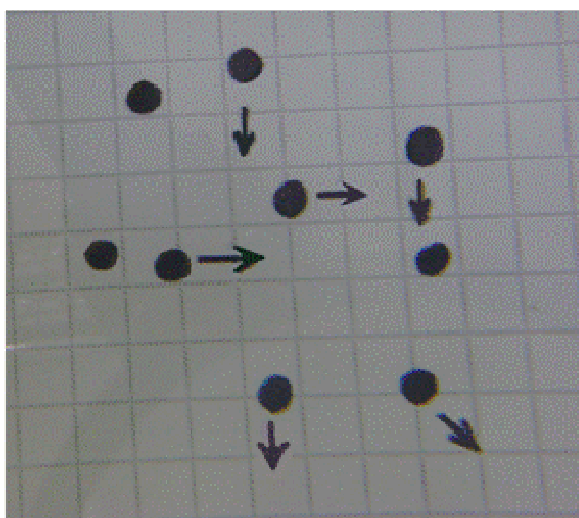
6.3.7.2 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* no meio mPA-B se situam entre 20 e 80 colônias. Para efetuar a contagem, observar as **figuras 3 e 4**.

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



FONTE: CETESB

FIGURA 3 – Modelo pra contagem das colônias (o círculo interno indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem)



FONTE: CETESB

FIGURA 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento (as colônias são contadas nos quadrados indicados pelas setas)

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

6.3.7.5 Quando os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo **item 7.2.4**.

6.3.7.6 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens superiores a 80, mas for possível contar as colônias no menor desses volumes, efetuar cuidadosamente a contagem dessas colônias.

6.3.7.7 Quando a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente) a contagem de colônias não é efetuada. Nesses casos deve ser avaliada a necessidade de coleta da amostra para a seleção de volumes mais adequados para a filtração de forma que sejam obtidas contagens de colônias dentro dos limites aceitáveis.

6.3.7.8 Após a contagem e o registro do número de colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa*, selecionar um número adequado para serem submetidas à confirmação, procedendo da seguinte forma:

a) se o número de colônias típicas de *P. aeruginosa* for igual ou inferior a dez, submeter todas à confirmação;

b) se o número de colônias típicas de *P. aeruginosa* for superior a dez, selecionar 10 colônias para serem submetidas à confirmação.

6.3.8 Procedimento de confirmação

6.3.8.1 Selecionar 10 colônias típicas bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de confirmação (se o número total de colônias for menor que dez, confirmar todas as colônias).

Identificar placas de ágar leite, de tal modo que a cada colônia corresponda uma placa.

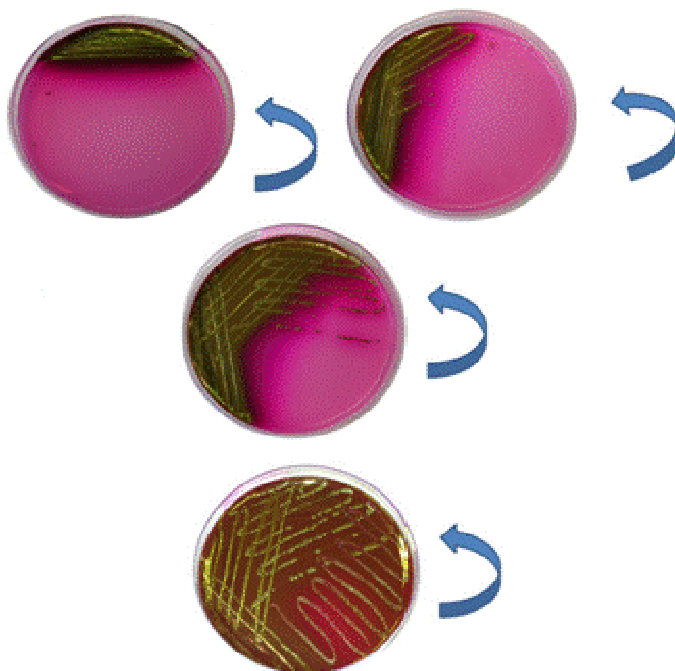
6.3.8.2 Flambar e resfriar uma alça de inoculação de platina ou níquel-cromo, com um aro de 3mm de diâmetro em sua extremidade.

6.3.8.3 Com a alça de inoculação, devidamente flambada e resfriada, colher um inóculo da colônia a ser submetida à confirmação.

6.3.8.4 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. (conforme demonstrado na **figura 5**)

6.3.8.5 Girar novamente a placa e continuar o espalhamento no segundo quadrante.

6.3.8.6 Proceder dessa maneira até completar a semeadura em toda a superfície do ágar.



FONTE: CETESB

FIGURA 5 – Procedimento de semeadura das placas de ágar para confirmação das colônias

6.3.8.7 Fechar e incubar a placa em posição invertida durante $48 \pm 3\text{h}$ a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

6.3.8.8 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura, considerando como típicas de *P. aeruginosa* as colônias que hidrolisarem a caseína e produzirem pigmento amarelado a verde, difusível no meio de cultura.

6.3.8.9 A partir do número de colônias confirmadas como *Pseudomonas aeruginosa*, calcular a densidade dessas bactérias conforme **item 7.1**.

Nota: Nos casos em que ocorrerem apenas colônias típicas e / ou atípicas em grande número (superior a 200) ou o crescimento for confluyente, para a confirmação de *P. aeruginosa*, uma parte representativa do crescimento na superfície da membrana é removido com auxílio de uma alça de inoculação (devidamente flambada e resfriada) ou uma haste de madeira estéril, sendo transferido para confirmação em placa de ágar leite.

Para a expressão dos resultados, observar o exposto no **item 7.2.5**.

7. Resultado

7.1 Cálculo

7.1.1 O cálculo da densidade de *Pseudomonas aeruginosa* é feito a partir do número de colônias típicas com resultado confirmativo positivo em ágar leite. Para contagens de colônias típicas iguais ou inferiores a 10, calcular a densidade de *Pseudomonas aeruginosa* em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$Pseudomonas\ aeruginosa / 100\text{ mL} = \frac{\text{N}^\circ\ \text{total de colônias confirmadas}}{\text{Volume filtrado de amostra (mL)}} \times 100$$

Exemplo:

Volume filtrado: 100mL

Total de colônias no mPA-B: 9

Total de colônias submetidas à confirmação em ágar leite: 9

Nº de colônias com resultados positivos em ágar leite: 7

$$Pseudomonas\ aeruginosa / 100\text{ mL} = \frac{7}{100} \times 100 = 7$$

7.1.2 Nos casos em que apenas uma parcela das colônias típicas em mPA-B foi submetida à confirmação em ágar leite, há dois casos a serem considerados:

7.1.2.1 Quando todas as 10 colônias testadas apresentarem confirmação positiva (confirmação de 100%), considerar o seguinte:

$$\text{N}^\circ\ \text{total de colônias confirmadas} = \text{N}^\circ\ \text{total de colônias típicas}$$

A seguir, calcular a densidade de *Pseudomonas aeruginosa*, aplicando a fórmula descrita no **item 7.1.1**.

7.1.2.2 Quando apenas parte das colônias, submetidas à confirmação em ágar leite, foi confirmada como *P. aeruginosa*, aplicar inicialmente a fórmula apresentada a seguir para o cálculo do número total de colônias confirmadas:

$$\text{N}^\circ\ \text{total de colônias confirmadas} = \frac{\text{N}^\circ\ \text{total de colônias típicas em mPA-B}}{\text{N}^\circ\ \text{de colônias submetidas à confirmação}} \times \text{N}^\circ\ \text{de colônias confirmadas}$$

A seguir, calcular a densidade de *P. aeruginosa*, aplicando a fórmula geral apresentada em 7.1.1.

Exemplo:

Volume filtrado: 20mL

Nº total de colônias típicas em m-PA-B: 40

Nº de colônias submetidas à confirmação em ágar leite: 10

Nº total de colônias confirmadas em ágar leite: 8

$$\text{Nº total de colônias confirmadas} = \frac{40}{10} \times 8 = 32$$

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = \frac{32}{20} \times 100 = 160$$

7.1.3 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado conforme item 6.3.7.4, calcular a densidade em 100 mL através da seguinte fórmula:

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = \frac{\text{Soma das colônias confirmadas}}{\text{Soma dos volumes correspondentes (mL)}} \times 100$$

Exemplos:

a)

Volumes filtrados: 4 de 25mL

Nº total de colônias confirmadas em ágar leite: 16, 19, 17 e 14

Cálculo da densidade de *Pseudomonas aeruginosa* em 100mL:

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = \frac{(16 + 19 + 17 + 14)}{(25 + 25 + 25 + 25)} \times 100$$

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = 66$$

b)

Volumes filtrados: 70, 25 e 5mL

Nº total de colônias confirmadas em ágar leite: crescimento confluyente, 70 e 20

Cálculo da densidade de *Pseudomonas aeruginosa* em 100mL:

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = \frac{(70 + 20)}{(25 + 5)} \times 100$$

$$\text{Pseudomonas aeruginosa} / 100 \text{ mL} = 300$$

7.1.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizaram 100mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e utilizar a fórmula geral apresentada no item 7.1.1 para o cálculo da densidade de *Pseudomonas aeruginosa* em 100 mL e item 7.2.3 para a expressão dos resultados.

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de *Pseudomonas aeruginosa* determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como:

Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* por 100 mL ou

UFC de *Pseudomonas aeruginosa* / 100 mL

7.2.2 Nos casos em que não foi possível efetuar a contagem devido a crescimento confluyente, expressar o resultado como:

Contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

7.2.3 No caso especificado em 7.1., em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero e os mesmos não totalizam 100mL, após o cálculo expressar o resultado obtido precedido do sinal <(menor que):

Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* / 100mL:< valor obtido

7.2.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero, mas os mesmos totalizaram 100mL, expressar o resultado como:

Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* / 100mL:< 1 (Ausente)

7.2.5 Quando a contagem não for efetuada devido ao grande número de colônias típicas e / ou atípicas que se desenvolveram na membrana (superior a 200) ou a ocorrência de crescimento confluyente, o resultado é expresso em função do resultado do teste de confirmação para *P. aeruginosa*:

a) quando o teste de confirmação para *P. aeruginosa* for positivo, relatar o resultado como:

Presença de *P. aeruginosa* - contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

b) quando o teste fornecer resultado negativo, relatar o resultado final conforme **item 7.2.4**

8. Referências bibliográficas

- ABNT NBR 10818:1989. Qualidade de água de piscina.
- Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani, MD 2002.The hospital water supply as a source of nosocomial infections. A plea for action. Arch. Intern. Med.162: 1483-1492.
- APHA; AWWA; WEF. 2007. Section 9213. Recreational waters. In: Standard Methods for the Examination of water and wastewater on line 2007. Approved by Standard Committee 2007.Disponível em <http://www.standardmethods.org>. data de acesso: 1/10/2008.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 275 de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/arquivos/RDC_275_2005.pdf. Data de acesso: 21/7/2010.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds). The Proteobacteria (Part B: The Gammaproteobacteria). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume dois, 2ª ed., 2005.
- CETESB. Guia de coleta e preservação de amostras de água. CETESB. São Paulo. 1988.
- CETESB 2007. Controle e garantia da qualidade nas análises microbiológicas de águas para consumo humano: procedimentos e critérios. São Paulo, CETESB 2007, 95p
- Craun GF, Calderon RL, Craun MF.2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. Int J Environ Health Res 15:243-62.
- Donlan AM 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8 (9): 881-890.
- Craun GF, Calderon RL, Craun MF 2005.Outbreaks associated with recreational water in the United States. Int J Environ Health Res 15:243-62
- Dutka, BJ. & Kwan, KK 1977. Confirmation of the single-step membrane filtration. procedure for estimating *Pseudomonas aeruginosa* densities in water. Appl. Environ. Microbiol. 33 (2): 240-245. 1977.
- European Union. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities. 5.12.98. p 330-354.
- Geldreich EE. Microbial quality of water supply in distribution systems CRC, Boca Raton,1996.
- Hardalo C, Edberg SC 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. Critical Reviews in Microbiology, 23(1): 47-75..

- Lightfoot NF. Bacteria of potential health concern. In: Bartran J et al. (Ed). Heterotrophic plate counts and drinking water safety. The significance of HPCs for water quality and human health. Geneve. WHO/IWA 2003. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/hpc/en/index.html. Data de acesso: 21/7/2010.
 - Mena KD, Gerba CP. 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Rev. Environm. Contam. Toxicol. 201: 71-107.
 - Todar K 2011. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Todar's on line textbook of bacteriology, Madison 2008. Disponível em <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Data de acesso: 21/7/2010.
 - WHO 2004. Guidelines for drinking water quality, 3ª ed. vol. I: Recommendations. World Health Organization, Genebra.
 - WHO 2006. Guidelines for safe recreational safe water environments. Volume 2: Swimming pools and similar environments. World Health Health Organization, Genebra.
-