



# NORMA TÉCNICA

L5.225

Dez/1990  
24 PÁGINAS

Determinação de colifagos em amostras de água: 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	<p style="text-align: center;"><b>DETERMINAÇÃO DE COLIFAGOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA</b></p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.225</p> <p style="text-align: center;">DEZ/90</p>
--------	---	---

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	2
5 Execução do ensaio.....	6
6 Expressão dos resultados.....	16
Anexo A - Esquema de procedimento I.....	17
Anexo B - Esquema de procedimento II.....	19
Anexo C - Recomendações de ordem geral.....	21
Anexo D - Referências bibliográficas.....	23

### INTRODUÇÃO

D'Herèlle em 1917 foi um dos primeiros pesquisadores a isolar e descrever um fenômeno lítico não específico em placas de culturas bacterianas. Este autor observou que o princípio lítico poderia ser passado diversas vezes de uma cultura para outra, levantando a hipótese de que se tratava de um vírus patogênico para a bactéria que causava lise de seu hospedeiro enquanto se multiplicava. Este microrganismo foi denominado de bacteriófago ou fago. Colifago é o nome genérico aplicado a bacteriófagos que atacam bactérias Escherichia coli. Diferentes tipos de fagos têm sido isolados de águas poluídas. Na literatura encontram-se relatos de diversos autores citando estudos feitos no sentido de tentar padronizar métodos de isolamento de colifagos para vários tipos de água. Estes métodos incluem filtrações, concentrações, plaqueamento direto ("pour plate" e "overlay"), método do número mais provável (NMP) e outros. Acredita-se que os colifagos estejam presentes sempre que as bactérias Escherichia coli são isoladas e por esta razão podem servir como indicadores de poluição. Atualmente, ainda o índice de coliformes é o parâmetro microbiológico correntemente utilizado para avaliar a qualidade da água e o risco de presença de microrganismos patogênicos. No entanto, tem-se levantado a questão quanto à sua utilidade em indicar a presença de vírus na água. A detecção de níveis de bacteriófagos na água tem sido então proposta por alguns pesquisadores como um meio de avaliação da contaminação da

água por esgoto onde estão presentes concomitantemente bactérias e vírus enteropatogênicos.

## 1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método utilizado para determinação de colifagos em amostras de água tratada, natural e de esgoto.

## 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

## 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as seguintes definições:

### 3.1 Colifagos

Nome genérico aplicado a bacteriófagos que atacam bactérias Escherichia coli.

### 3.2 Placas

Áreas circulares incolores na camada de crescimento bacteriano confluente, visíveis quando a E.coli infectada é lisada.

### 3.3 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

### 3.4 p.a.

Para análise.

### 3.5 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

## 4 APARELHAGEM

### 4.1 Vidraria, materiais e equipamentos

#### 4.1.1 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda a vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação

do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à temperatura de 170 a 180°C.

#### 4.1.2 Autoclave

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

#### 4.1.3 Incubadora bacteriológica

Dever ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça preferencialmente na faixa de 16 a 27°C.

#### 4.1.4 Banho-maria

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

#### 4.1.5 Destilador de água ou aparelho para desionização

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

#### 4.1.6 Potenciômetro

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

#### 4.1.7 Balança

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

#### 4.1.8 Refrigerador

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

#### 4.1.9 Congelador

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C. É destinado ao armazenamento das suspensões da bactéria padrão E.coli C. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

#### 4.1.10 Contador de colônias

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

#### 4.1.11 Espectrofotômetro

Com monocromador de espectro contínuo na faixa visível de 520 nm, transmitância de 0-100% e absorvância de 0-2.

#### 4.1.12 Materiais para preparação de meios de cultura

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

#### 4.1.13 Frascos para coleta de amostras

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

#### 4.1.14 Pipetas

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

#### 4.1.15 Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o volume necessário de meio de cultura e

o inóculo da amostra. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm e 16 mm x 150 mm.

#### 4.1.16 Placas de Petri

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

#### 4.1.17 Bico de Bunsen

#### 4.1.18 Tripé

#### 4.1.19 Tela de amianto

De tamanho 22 x 22 cm.

#### 4.1.20 Alças de inoculação

De platina, platina-irídio ou níquel-cromo, com 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm; com cabo de metal (cabo de Kolle).

#### 4.1.21 Estantes

Para tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm e 16 mm x 150 mm, podendo ser de arame galvanizado (para utilização em incubadoras) ou de aço inoxidável ou arame galvanizado plastificado (para utilização em banho-maria).

#### 4.1.22 Porta-pipetas de aço inoxidável

#### 4.1.23 Seringa automática

Tipo Cornwall, de 10 mL.

#### 4.1.24 Alcoômetro

#### 4.1.25 Flaconete

Do mesmo tipo utilizado para acondicionar penicilina, com capacidade de 5 mL, e tampa de borracha.

#### 4.1.26 Algodão hidrófilo

#### 4.1.27 Fita crepe

#### 4.1.28 Fitas adesivas

Para controle do material submetido à esterilização, em estufa ou autoclave.

#### 4.1.29 Papel alumínio

#### 4.1.30 Papel Kraft

## 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 5.1 Princípio do método

A determinação de colifagos em uma amostra baseia-se no princípio de que, definindo condições de nutrição, hospedeiro, temperatura e tempo de incubação, se houver colifagos na água, haverá formação de placas de lise que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para tal, volumes adequados da amostra são inoculados, juntamente com a cultura da bactéria hospedeira E.coli C, em placas de Petri contendo meio de cultura específico. Os colifagos infectam e se multiplicam na bactéria sensível e, após um período de incubação de 4 a 6 horas a 35°C se formarão áreas circulares de descontinuidade do crescimento bacteriano, as placas, em todos os locais onde as bactérias foram lisadas por partículas de fagos. Cada bacteriófago infectante produz na célula do hospedeiro aproximadamente 200 descendentes e estes infectarão a seguir as células bacterianas vizinhas. A partir da contagem das placas formadas no meio de cultura específico, calcula-se o número de colifagos presentes na amostra.

### 5.2 Meios de cultura e soluções

#### 5.2.1 Reagentes

5.2.1.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizados nesse ensaio são os seguintes os reagentes necessários:

- a) ácido clorídrico fumegante (HCl) p.a.;
- b) ágar;
- c) ágar nutriente;
- d) álcool etílico comercial;
- e) caldo nutriente;
- f) cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- g) dextrose;
- h) EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) p.a.;
- i) extrato de carne em pasta;
- j) fosfato dipotássico anidro ( $K_2HPO_4$ ) p.a.;
- k) glicerina p.a.;
- l) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- m) nitrato de amônia ( $NH_4NO_3$ ) p.a.;
- n) nitrato de estrôncio ( $Sr(NO_3)_2$ ) p.a.;
- o) peptona de soja;
- p) tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) p.a.; e
- q) tripton.

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

5.2.2 Preparo de meios de cultura

5.2.2.1 Caldo de soja e triptona glicerinado

Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Dextrose .....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico anidro (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) p.a..	2,5 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Resfriar a 25°C e ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Acrescentar no meio 10% de glicerina p.a. e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, de 2 a 8°C.

5.2.2.2 Ágar de soja e triptona

Fórmula:

Triptona.....	15,0 g
Peptona de soja.....	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução. Resfriar e ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. A esterilização é efetuada em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Notas: a) Antes da autoclavação, distribuir volumes de 5 a 8 mL em tubos de 12 mm x 120 mm, tamponar e esterilizar. Após a



esterilização e enquanto o meio ainda estiver quente, locolocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique;

- b) Para distribuição em placas de Petri, autoclavar o meio previamente, resfriar a 45°C e distribuir assepticamente, com seringa automática tipo Cornwall, volumes de 20 a 25 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm. Armazenar em geladeira.

#### 5.2.2.3 Ágar de soja e triptona modificado

##### Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona.....	3,0 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico anidro (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) p.a.....	2,5 g
Nitrato de amônia (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) p.a.....	1,6 g
Nitrato de estrôncio (Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) p.a.....	0,21 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

##### Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução. Resfriar e ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Distribuir volumes de 5,5 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 5.2.2.4 Caldo nutriente 20 x concentrado

##### Fórmula:

Caldo nutriente (Difco).....	160 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	100 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

##### Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 100 mL em frascos apropriados. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira de

2 a 8°C.

#### 5.2.2.5 Caldo nutriente

##### Fórmula:

Caldo nutriente (Difco).....	8 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

##### Preparo:

Pesar 8 g de caldo nutriente e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, de 2 a 8°C.

Nota: Na falta do caldo nutriente desidratado, pesar:

Extrato de carne.....	3 g
Peptona.....	8 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

#### 5.2.2.6 Ágar nutriente

##### Fórmula:

Ágar nutriente (Difco).....	23 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

##### Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Resfriar e ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Resfriar a 45°C e distribuir assepticamente, com seringa tipo Cornwall, volumes de 20 a 25 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm. Armazenar em geladeira, de 2 a 8°C.

Nota: Na falta do ágar nutriente desidratado pesar:

Extrato de carne.....	3 g
Peptona.....	8 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

#### 5.2.2.7 Ágar nutriente de superfície

##### Fórmula:

Caldo nutriente.....	8 g
----------------------	-----

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5 g
Ágar.....	10 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente até a completa dissolução. Resfriar e ajustar o pH para 7,2 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Distribuir volumes de 5,5 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.2.3 Preparo de soluções5.2.3.1 Solução de ácido clorídrico 1NFórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%) p.a.....	83,5 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Diluir vagorosamente 83,5 mL de ácido clorídrico fumegante em 1 000 mL de água destilada. Adicionar o ácido à água e nunca a água sobre o ácido.

5.2.3.2 Solução de hidróxido de sódio 1NFórmula:

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

Preparo:

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

5.2.3.3 Solução de álcool a 70%Preparo:

A 700 mL de álcool etílico comercial acrescentar quantidade de água suficiente (aproximadamente 200 a 300 mL) para obter uma solução de álcool a 70%. Essa verificação é feita através do uso do alcoômetro.

5.2.3.4 Solução de tiosulfato de sódio 1,8%Fórmula:

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

Preparo:

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

5.2.3.5 Solução de EDTA a 15%Fórmula:

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

Preparo:

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

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

5.3 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB.

5.3.1 Amostra

5.3.1.1 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).

5.3.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para

neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

5.3.1.3 Agentes quelantes: para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

5.3.1.4 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e início do exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

#### 5.4 Procedimento para análise de amostras de águas naturais e de esgoto

##### 5.4.1 Preparo da cultura bacteriana hospedeira Escherichia coli C (ATCC nº 13 706)

5.4.1.1 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, colher um inóculo da cultura estoque de E.coli C, contida em tubo com ágar de soja e triptona, e transferi-la para 10 mL de caldo de soja e triptona glicerinado.

5.4.1.2 Incubar esse meio a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 18 a 24 horas.

5.4.1.3 Após o período de incubação e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir o volume de 10 mL para um frasco que contém 25 mL de caldo de soja e triptona glicerinado.

5.4.1.4 Homogeneizar a suspensão bacteriana e incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  até obter uma densidade óptica de 0,5 a 520 nm (essa medida é equivalente a  $1 \times 10^9$  E.coli/mL). As leituras da densidade óptica são realizadas em espectrofotômetro previamente calibrado com caldo de soja e triptona glicerinado estéril.

5.4.1.5 Com uma pipeta esterilizada transferir volumes de 4,5 mL da suspensão bacteriana para flaconetes estéreis e vedar.

5.4.1.6 Estocar em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , no período máximo de 6 semanas.

#### 5.4.2 Realização do ensaio

5.4.2.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório, usando uma solução de álcool a 70% ou outro desinfetante que não deixe resíduos.

5.4.2.2 Para o início da análise proceder da seguinte maneira:

- a) descongelar os frascos da bactéria hospedeira E.coli C em banho-maria a  $44,5^{\circ}\text{C}$ . Utilizar um frasco da cultura hospedeira para cada amostra;
- b) fundir 4 tubos de ágar de soja e triptona modificado e estabilizá-los em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$ ;
- c) efetuar a marcação de 4 placas de Petri contendo ágar de soja e triptona, anotando, na tampa de cada placa, o número designado pela laboratório na ficha de registro de exames, o tipo de água e a diluição, se utilizada;
- d) homogeneizar a amostra, por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente  $45^{\circ}$  entre o braço e o antebraço), e agitando vigorosamente; repetir a operação no mínimo 25 vezes;
- e) para amostras que contenham menos que 1 000 colifagos/100 mL, homogeneizar segundo o item 5.4.2.2.d e proceder à inoculação conforme descrito em 5.4.2.3;
- f) para amostras que contenham mais de 1 000 colifagos/100 mL, efetuar diluições decimais com água destilada estéril, procedendo da seguinte forma:
  - anotar, em cada frasco de água destilada estéril, o número da amostra e a diluição que deverá conter;
  - homogeneizar a amostra (como em 5.4.2.2.d) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco pre

- viamente identificado, contendo  $90 \pm 2$  mL de água destilada estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 da amostra;
- repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente ( $10^{-1}$ ) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, transferir 10 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo  $90 \pm 2$  mL de água destilada estéril. Prepara-se assim a 2ª diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra.
  - se necessário, proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , ..... $10^{-6}$ .....);
  - após o preparo das diluições, selecionar a diluição apropriada e proceder à inoculação, como descrito em 5.4.2.3.

5.4.2.3 Com uma pipeta esterilizada de 5 mL e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 5 mL da amostra ou da diluição apropriada para cada um dos 4 tubos de ágar de soja e triptono modificado.

5.4.2.4 Desprezar a pipeta e, com uma pipeta de 1 mL, inocular 1 mL da bactéria hospedeira E.coli C a cada um dos tubos.

Nota: Para se obter uma coloração rosada no meio de cultura, durante a leitura dos testes, pode-se adicionar a cada um dos tubos de ágar de soja e triptono modificado 0,08 mL da solução de 2,3,5 - triphenyl tetrazolium chloride (TPTZ) a 1% em etanol.

5.4.2.5 Homogeneizar lentamente o conteúdo dos tubos e verter cada um deles em placas de Petri, contendo ágar de soja e triptono, previamente marcadas.

5.4.2.6 Homogeneizar cada placa de Petri com movimentos circulares em forma de um oito (8), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o ágar com o inoculo na tampa da placa.

5.4.2.7 Após a solidificação do ágar, incubar as placas em posição invertida, a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 4 a 6 horas.

5.4.2.8 Após o período de incubação, efetuar a contagem de todas as placas de lise formadas no ágar, com o auxílio de um contador de colônias Quebec ou similar.

## 5.5 Procedimento para análise de amostras de água tratada

### 5.5.1 Preparo da cultura bacteriana hospedeira Escherichia coli C (ATCC nº 13 706)

5.5.1.1 Com o auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, colher um inóculo da cultura estoque de E.coli C contida em um tubo de ágar nutriente e transferi-la para 50 mL de caldo nutriente.

5.5.1.2 Incubar esse meio a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 18 a 24 horas.

### 5.5.2 Realização do ensaio

5.5.2.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório, usando uma solução de álcool a 70% ou outro desinfetante que não deixe resíduos.

5.5.2.2 Para o início da análise proceder da seguinte maneira:

- a) fundir 4 tubos de ágar nutriente de superfície e estabilizá-los em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$ ;
- b) efetuar a marcação de 4 placas de Petri contendo ágar nutriente, anotando, na tampa de cada placa, o número designado pelo laboratório na ficha de registro de exames;
- c) a cada 100 mL de amostra acrescentar, com uma pipeta esteril, 5 mL de caldo nutriente 20 vezes concentrado e 10 mL da cultura bacteriana hospedeira com 18-24 horas de crescimento em caldo nutriente;
- d) homogeneizar a amostra e incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, com agitação constante;
- e) após o período de incubação, transferir 5 mL da amostra para cada um dos 4 tubos de ágar nutriente de superfície e acrescentar 4 gotas da cultura bacteriana hospedeira;
- f) homogeneizar lentamente o conteúdo dos tubos e verter cada um deles em placas de Petri, contendo ágar nutriente;
- g) homogeneizar cada placa de Petri com movimentos circulares em forma de oito ( $\infty$ ), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o ágar com o inóculo na tampa da placa;
- h) após a solidificação do ágar, incubar as placas em posição invertida, a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 4 a 6 horas;
- i) após o período de incubação, efetuar a contagem de todas as placas de lise formadas no ágar, com o auxílio de um



contador de colônias Quebec ou similar.

## 6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1 Amostras de águas naturais e de esgoto

6.1.1 O número de colifagos é obtido multiplicando-se por 5 a soma tória da contagem das placas de lise nas 4 placas de Petri utilizadas. O resultado é expresso como unidades formadoras de placa (UFP) por 100 mL da amostra.

Exemplo:

Placas de Petri	I	II	III	IV	Total
Placas de lise	5	5	9	6	= 25

Cálculo:

$$25 \times 5 = 125 \text{ placas/100 mL}$$

6.1.2 Quando forem utilizadas diluições da amostra, o cálculo é obtido multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição correspondente. No exemplo descrito no item 6.1.1, considerando ter sido utilizada a diluição decimal  $10^{-1}$ , o resultado final será 1250 placas/100 mL (125 multiplicado pelo fator de diluição 10).

### 6.2 Amostras de água tratada

6.2.1 O aparecimento de placas de lise no ágar é indicação positiva da presença de colifagos. O resultado é expresso como presença de colifagos em 100 mL da amostra.

6.2.2 Na ausência de placas de lise, a análise, é considerada negativa e o resultado é expresso como ausência de colifagos em 100 mL da amostra.

---

/ANEXO A

ANEXO A - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO I

As Figuras A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> mostram o esquema de procedimento para aplicação do método de detecção de colifagos em amostras de águas naturais e de esgoto.

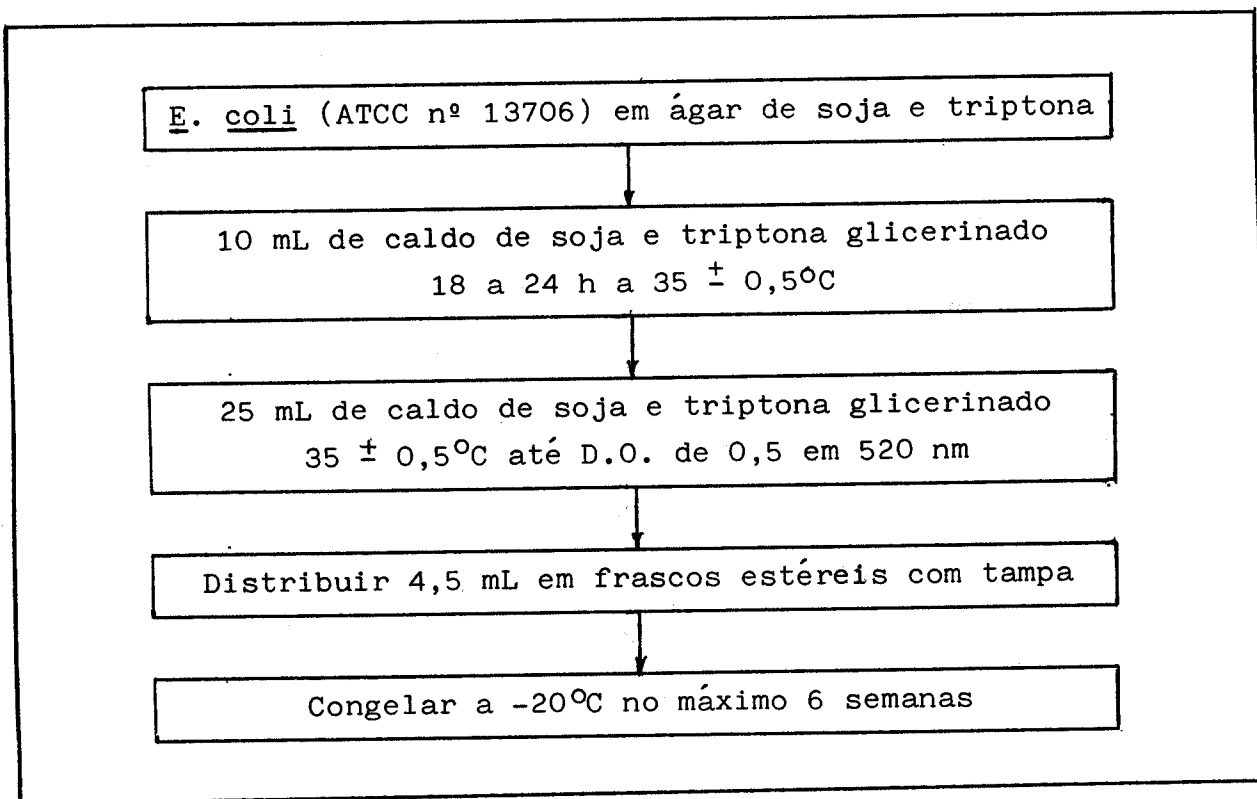


FIGURA A<sub>1</sub> - Fluxograma da preparação da suspensão bacteriana

/FIGURA A<sub>2</sub>

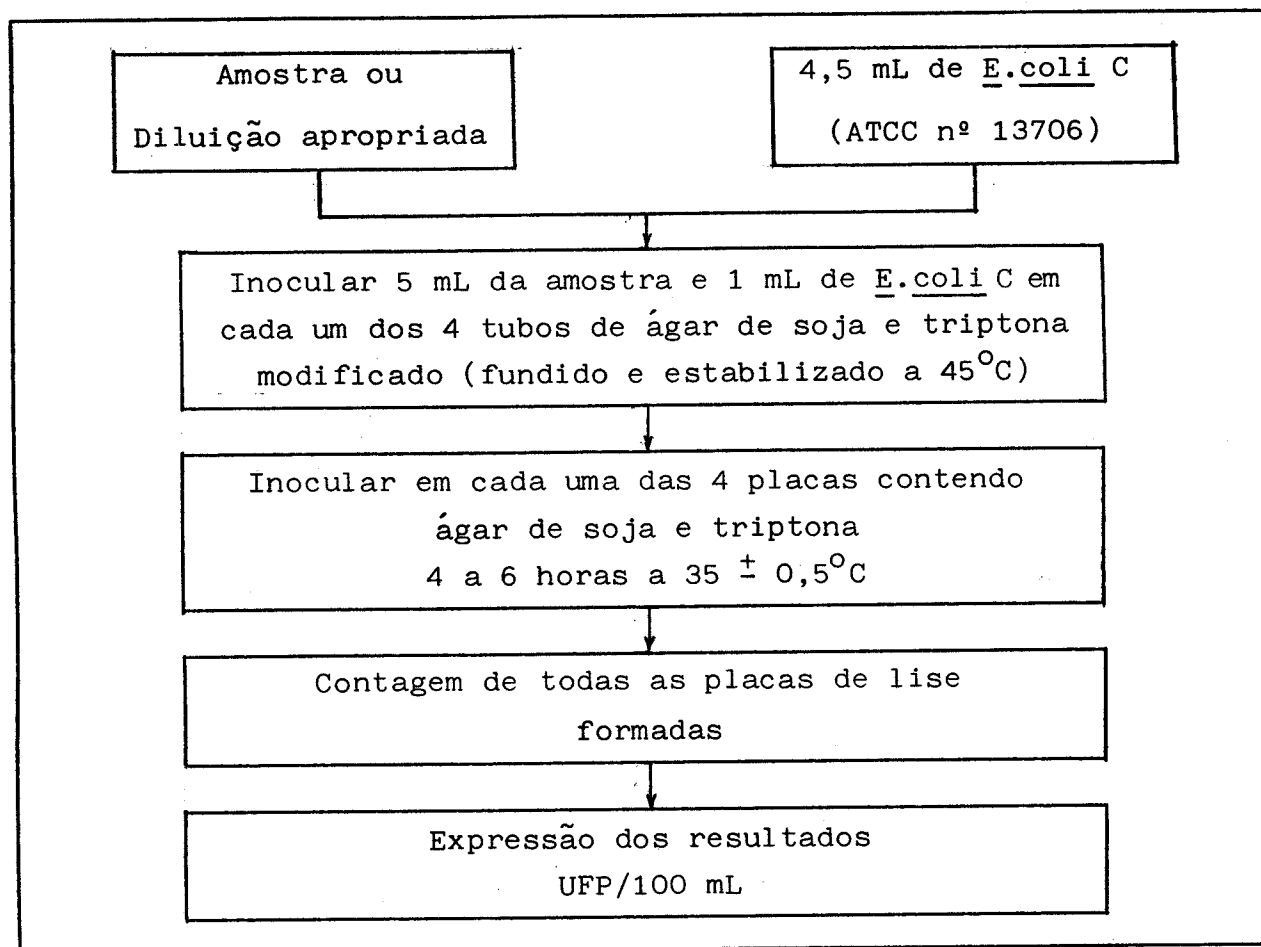


FIGURA A<sub>2</sub> - Fluxograma para a realização do ensaio

ANEXO B - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO II

As Figuras B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> mostram o esquema de procedimento para aplicação do método de detecção de colifagos em amostras de água tratada.

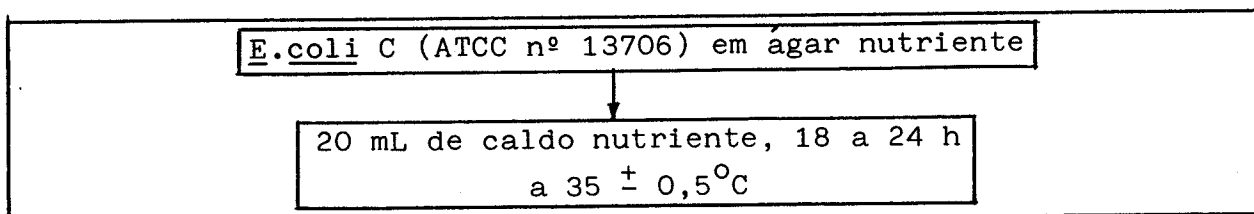


FIGURA B<sub>1</sub> - Fluxograma da preparação da suspensão bacteriana

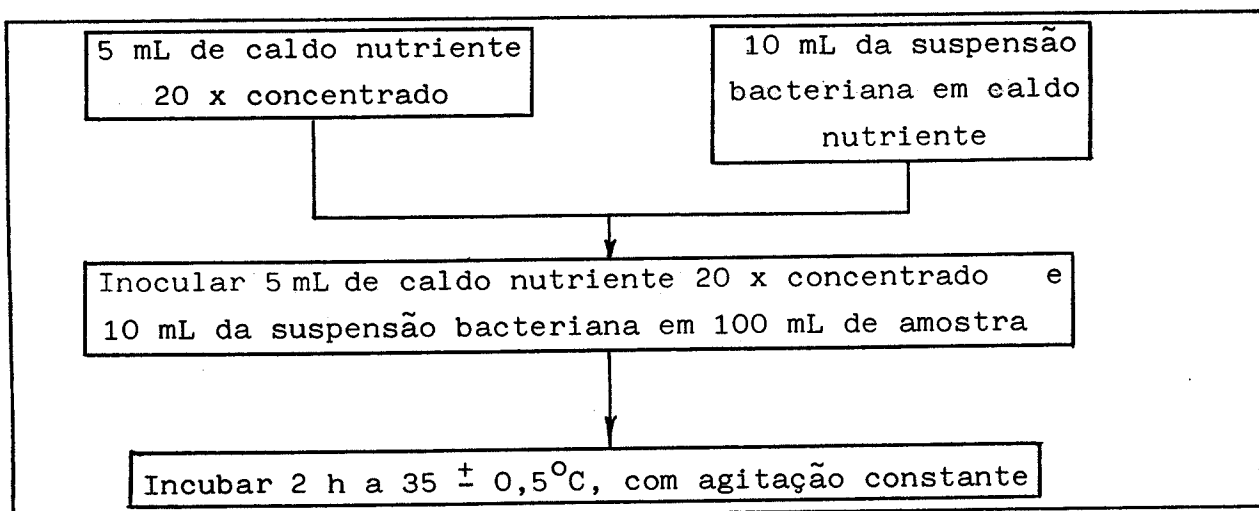


FIGURA B<sub>2</sub> - Fluxograma do enriquecimento da amostra

/FIGURA B<sub>3</sub>

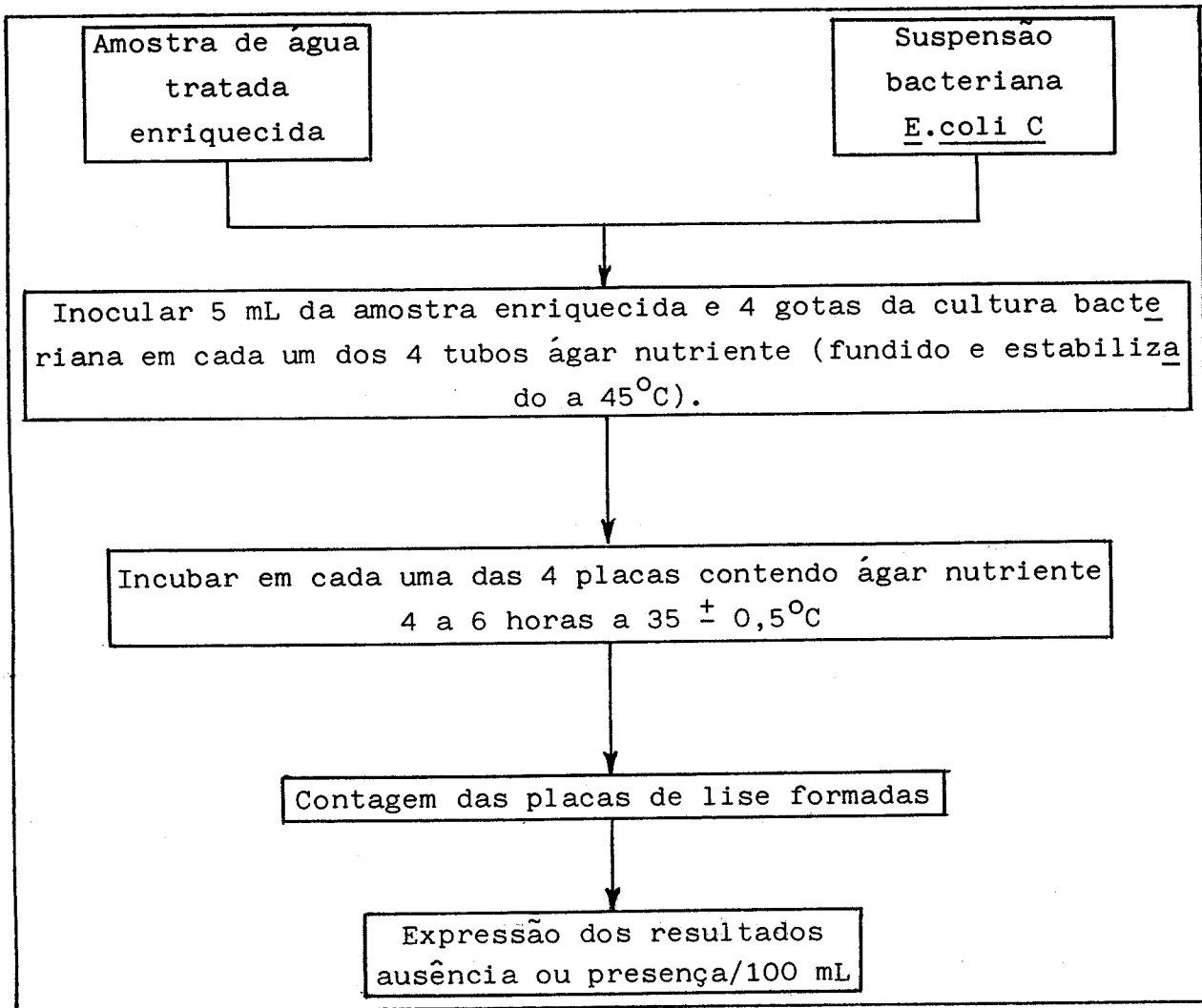


FIGURA B<sub>3</sub> - Fluxograma para a realização do ensaio

ANEXO C - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALC-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

C-2 Controle da eficiência da autoclave

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

C-3 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de ensaios específicos. Ver Norma CETESB L5.215.

C-4 Cuidados no preparo dos meios de cultura

C-4.1 O ágar utilizado nos meios de cultura deverá ser purificado, especial para análise microbiológicas.

C-4.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água destilada fria, principalmente para os meios que contém ágar, pois, se for utilizada água quente, forma-se imediatamente, em torno de cada partícula de ágar uma película que protege o núcleo. Com a elevação da temperatura, ocorre um aquecimento seco do núcleo, que impede que a partícula se umedeça totalmente. Por esse motivo, aconselha-se deixar os meios que contenham ágar de molho durante 15 minutos em água destilada fria, agitando-se a mistura freqüentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo para facilitar a homogeneização.

C-5 Controle de qualidade dos meios de cultura

C-5.1 Todos os reagentes usados no preparo dos meios de cultura devem ser de grau bacteriológico. Isto é particularmente importante, pois certas impurezas químicas encontradas em reagentes de grau inferior ou comercial podem estar presentes em concentrações suficientes para suprimir ou inibir o crescimento bacteriano, ou possibilitar a

ocorrência de reações inespecíficas.

C-5.2 Antes e após a esterilização, deve-se verificar o pH de cada partida de meio de cultura preparado, anotando-se seu valor, a data e o número de controle do lote. Esta verificação é fundamental, pois há possibilidade de ocorrência de erros nas pesagens, aquecimento excessivo, contaminação química.

C-5.3 Após terem sido preparados e antes de serem usados, os meios de cultura devem ser rotineiramente testados quanto à presença de bactérias e fungos.

#### C-6 Precauções

C-6.1 Ao fundir o ágar e triptona modificado evitar:

- a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o ágar, pois esta, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;
- b) exposição prolongada a temperaturas elevadas durante e após a fusão;
- c) fundir quantidade do meio superior à que será usada.

---

/ANEXO D

ANEXO D - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Rapid Detection Methods - Coliphage Detection (proposed). In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17 ed., Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1989, p. 9-36 a 9-41.
- D-2 ADAMS, M.H. Bacteriophages. Interscience Public Inc. New York, 1959.
- D-3 BURAS, N. & KOTT, Y. bacteriophage as an indicator for the estimation of water pollution. Israel J. Med. Sci., 2: 660, 1986.
- D-4 CETESB. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 1ª Revisão (Norma Técnica M1.001).
- D-5 \_\_\_\_\_. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985. 1ª Revisão (Norma Técnica L5.215).
- D-6 \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (Norma Técnica L5.216).
- D-7 \_\_\_\_\_. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB São Paulo, 1982, 201 p.
- D-8 HILTON, M.C. & STOTZKY, G. Use of coliphages as indicators of water pollution. Can. J. Microbiol., 19: 747-751, 1973.
- D-9 KOTT, Y. ROZE, N.; SPERBER, S. & BETZER, N. Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Res., 8: 165-171, 1974.
- D-10 KOTT, Y. Bacteriophages as sewage pollution indicators. Presented in a Seminar os "Microbiological Indicators of Pollution and Health Hazards", São Paulo, 1978.
- D-11 PRIMROSE, S.B. & Day, N. Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol., 42: 417-421, 1977.



- D-12 SCARPINO, P. Bacteriophage indicators. In: BERG. G., Indicators of viruses in water and food, Ann Arbor Science Publishers, Inc, Ann Arbor, MI, 201, 1978.
- D-13 SCOTT, W.M.; O'NEILL, P.E.; WILKINSON, M.J. & KITCHENS, J. F. Evaluation of coliform bacteria and relationships in assessment of water quality. Final Technical Report NSF Grant n° PFR78-19196, December, 1979.
- D-14 SEELEY, N.D. & PRIMROSE, S.B. Concentration of Bacteriophages from natural water. J. Appl. bacteriol., 46: 103-116, 1979.
- D-15 WENTSEL, R.S.; O'NEILL, P.E. & KITCHENS, J.F. Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. Appl. Environ. Microbiol., 43: 430-434, 1982.
-