



NORMA TÉCNICA

L5.230

2ª Edição
Junho2012
21 páginas

***Escherichia coli*: Determinação pela técnica de membrana filtrante em amostras de águas - método de ensaio**

Escherichia coli - Determination in water samples by membrane filtration technique: Test Method

Prescreve o método para quantificação de *Escherichia coli* (*E. coli*) pela técnica de membrana filtrante, utilizado para: avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas e estuarinas, avaliação da qualidade de corpos d'água receptores, despejos domésticos e industriais.

E. coli, Análise bacteriológica, Análise da água, Membrana filtrante

E. coli, Bacteriological analysis, Water analysis, Membrane Filtration

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

Novembro/1999, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D.. n. 066/91/P/N, de 13/05/91.

Segunda Edição

Junho/2012, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 008/13/E, de 16/01/2013. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.123, n. 14, de 22/01/13, Poder Executivo, Seção I, p. 40 a 45.

© CETESB 2012

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

Sumário	página
1 Introdução.....	2
2 Escopo.....	3
3 Documentos complementares.....	3
4 Materiais.....	3
5 Meios de cultura e soluções.....	7
6 Execução do ensaio.....	12
7 Resultado.....	17
8 Procedimento de verificação para controle de qualidade.....	18
9 Referências.....	20

1 Introdução

As bactérias do grupo coliforme têm sido utilizadas por mais de um século na avaliação da qualidade microbiológica de amostras ambientais (ROMPRÉ et al., 2002, TALLON et al., 2005), e atendem vários dos requisitos de um bom indicador de contaminação fecal.

Segundo as publicações mais recentes da Organização Mundial da Saúde e da Associação Americana de Saúde Pública, bactérias do grupo coliforme são definidas como micro-organismos capazes de fermentar a lactose na presença de agentes tensoativos, em temperaturas de 35°C (coliformes totais) ou 44 – 45°C (coliformes fecais ou termotolerantes), com formação de ácido, gás e aldeído (APHA, 2007, WHO, 2011) Esses micro-organismos estão presentes no trato intestinal de humanos e de diversos animais, mas também podem ser isolados do ambiente (solo, águas superficiais poluídas e plantas).

Escherichia coli, é uma das espécies desse grupo a qual, particularmente, possui a capacidade de crescer e fermentar a lactose em temperatura mais elevada, e seu habitat é quase que exclusivamente restrito ao trato intestinal de seres humanos e animais de sangue quente. As demais espécies de coliformes termotolerantes apesar de compartilharem o mesmo habitat de *E. coli*, também são encontradas naturalmente no ambiente, o que faz de *E. coli* um melhor indicador da presença de contaminação fecal em amostras ambientais quando comparada às demais espécies de coliformes.

Embora já na década de 70 fossem conhecidas as limitações do uso dos coliformes termotolerantes como indicadores da contaminação fecal de amostras ambientais, os métodos para identificação de *E. coli* eram ainda caros, complexos e demorados, sendo assim disponíveis apenas para laboratórios especializados (EDBERG et al. 2000). Na década de 80, o desenvolvimento de métodos analíticos baseados na presença de enzimas de determinados grupos de micro-organismos, como por exemplo, a β -D-glicuronidase presente em 95% das linhagens de *E. coli*, permitiu que as análises dessa bactéria fossem adotadas na rotina dos laboratórios de análises bacteriológicas de água (EDBERG et al., 2000, TALLON et al, 2005). A pesquisa de *E. coli* no monitoramento de corpos d'água utilizados para uso recreacional tem sido adotada pela legislação de diversos países (EP 2006; USEPA 1986).

No Brasil, a Resolução CONAMA 357/2005, utiliza como padrão de qualidade microbiológico os coliformes termotolerantes para a classificação e enquadramento dos corpos d'água, mas permite que esse parâmetro seja substituído pela análise de *E. coli*, de acordo com critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

2 Escopo

Esta norma descreve o método de quantificação de *Escherichia coli* utilizando a técnica de membrana filtrante. Tal metodologia deve ser aplicada no atendimento das seguintes demandas:

- Controle de qualidade de águas brutas destinadas: ao abastecimento público (após tratamento convencional ou simplificado, ou com simples desinfecção), à irrigação de hortaliças e plantas, à recreação de contato primário (natação, esqui-aquático, mergulho); à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana e à dessedentação de animais;
- Avaliação do grau de contaminação fecal em cursos d'água;
- Avaliação da eficiência dos processos de tratamento de esgoto.

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:

- USEPA. Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water. Criteria and procedures. Quality Assurance. 5th Edition. EPA 815-R-005-04. January 2005. Disponível em: http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/manual_labcertification.pdf. Acesso em 21/11/2012.
- CETESB/ANA. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p.

4 Materiais

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balanças

Nota: As balanças devem ser instaladas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura. Calibrações periódicas devem ser efetuadas, bem como verificações da balança com massas de referência.

4.1.1.1 Balança de topo

É utilizada para pesar quantidades superiores ou iguais a 2g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g.

4.1.1.2 Balança analítica

É utilizada para pesar quantidades inferiores a 2g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo 1mg ao serem pesados 10g.

4.1.2 Destilador de água ou purificador de água

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA 2005).

4.1.3 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 (Exemplo: pH = 6,86 e pH = 4,0 ou pH = 9,18), de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada.

4.1.4 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.

4.1.5 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 graduação ou resolução igual ou menor que 10°C, com o seu bulbo ou sensor colocado na areia, durante o uso.

4.1.6 Equipamentos para filtração

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

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

Nota: Como alternativa ao uso do frasco Kitasato, pode-se utilizar um garrafão reforçado para vácuo em polipropileno, apresentando tampa com sistema de enchimento.

4.1.6.3 Frasco Kitasato 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.

4.1.6.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável (Figura 1)

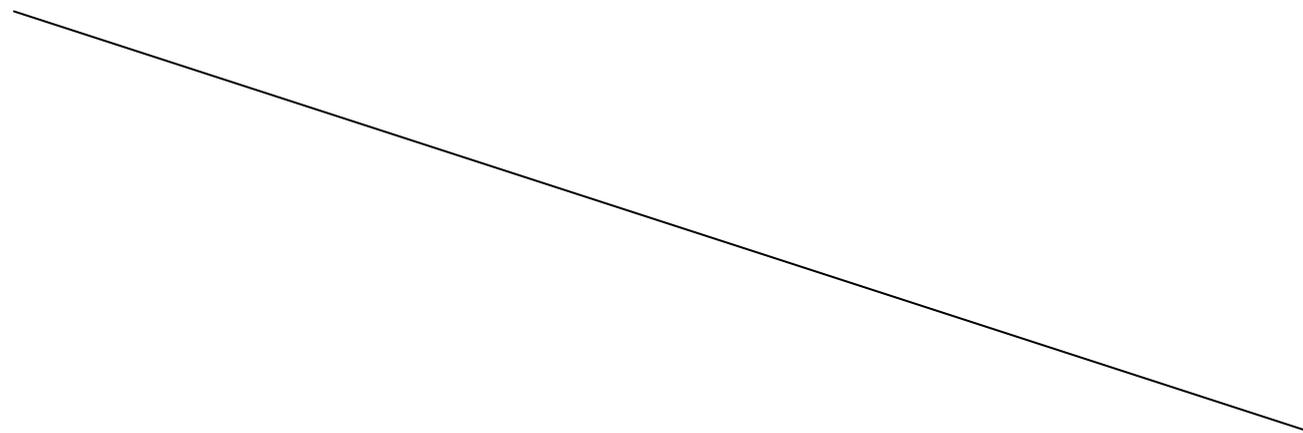


Figura 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração**FONTE: CETESB**

4.1.7 Incubadora bacteriológica (35°C)

Deve manter a temperatura na faixa requerida ($35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,5^{\circ}\text{C}$ e estar imerso em líquido.

4.1.8 Banho-maria (44,5°C)

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme na faixa requerida ($44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para imergir os sacos plásticos (contendo as placas de Petri com o meio de cultura e a membrana), sendo recomendada a troca semanal da água, para evitar a proliferação de fungos e outros micro-organismos. O termômetro utilizado para o controle do banho-maria deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,1^{\circ}\text{C}$.

4.1.9 Incubadora do tipo Jaqueta d' água (44,5°C)

Deve manter a temperatura na faixa requerida de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Esta faixa de temperatura é obtida por meio da circulação de água aquecida ao redor de uma câmara externa, o que mantém a temperatura no interior da incubadora constante. O termômetro utilizado para o controle do banho-maria deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,1^{\circ}\text{C}$.

4.1.10 Microscópio estereoscópico binocular

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

4.1.11 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C e ter capacidade para armazenar meios de cultura, reagentes, soluções ou amostras que necessitam de refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 1°C e estar imerso em líquido.

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Balões

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

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

De vidro neutro ou 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) com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4 Frasco para água de diluição

De borossilicato ou 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, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.5 Pipetas

Tipo Mohr, para 10mL e 5mL com graduação de 1/10, 2mL e 1mL com graduação de 1/100 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.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5mm de diâmetro e 7 a 8cm de comprimento, com um aro de 3mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle). Também podem ser utilizadas alças plásticas descartáveis e pré-esterilizadas.

Nota: Alternativamente, 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

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

4.3.8 Placas de Petri para membrana filtrante

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

4.3.9 Recipientes para preparação de meios de cultura

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

4.3.10 Sacos plásticos

Utilizados para o acondicionamento das placas de Petri de plástico (contendo o meio de cultura e a membrana filtrante); quando a incubação desse material é efetuada em banho-maria, esses sacos devem oferecer condições ótimas de vedação.

4.3.11 Termômetros

Os termômetros de vidro devem ter escala adequada ao uso (faixa de medição e graduação) e a coluna de líquido não deve apresentar interrupções. Os termômetros eletrônicos digitais devem apresentar faixa de medição, resolução, exatidão e precisão adequadas ao uso.

Todos os termômetros devem ser calibrados periodicamente e a correção da temperatura deve ser efetuada, quando aplicável.

Nota: Não se recomenda a utilização de termômetros de vidro contendo mercúrio.

5 Meios de cultura e soluções

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

5.1. Ágar mTEC modificado

5.1.1 Fórmula:

Proteose peptona.nº 3	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Lactose	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	7,5g
Monohidrogeno fosfato de potássio(K ₂ HPO ₄)	3,3g
Dihidrogeno fosfato de potássio(KH ₂ PO ₄)	1,0g
Lauril sulfato de sódio	0,2g
Desoxicolato de sódio	0,1g
5-bromo-6-cloro-3-indoxil-β-D-glicuronídeo	0,5g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,3 ± 0,2 a 25°C

5.1.2 Preparo

Pesar o meio desidratado ágar mTEC modificado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. 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. Após esterilização, manter o meio preparado em banho-maria a 50-55°C, para estabilização da temperatura, até o momento de sua distribuição. Distribuir volumes de aproximadamente 4 a 5mL em placas de Petri de plástico de 49mm x 13mm estéreis.

5.1.3 Armazenamento

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

5.2 Água de diluição

5.2.1 Fórmula:

Solução-estoque A	1,25mL
Solução-estoque B	5,00mL
Água purificada	1000mL

5.2.2 Preparo

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

Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	34,0g
Água purificada	1000mL

Dissolver o dihidrogenofosfato de potássio em 500mL de água purificada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000mL. 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;

Nota: 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 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	81,1g
Água purificada	1000mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água purificada e completar o volume para 1000mL. 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;

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

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

Nota: A água de diluição a ser utilizada no enxágüe de porta-filtros, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões ou frascos 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).

5.2.3 Armazenamento

A solução preparada poderá ser estocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (inferior a 30°C), durante, no máximo, duas semanas.

5.3 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.3.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH)	40,0g
Água purificada	1000mL

5.3.2 Preparo

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em uma balão volumétrico e completar o volume para 1000mL com água purificada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

5.3.3 Armazenamento

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

5.4 Ágar nutriente

5.4.1 Fórmula:

Extrato de carne	3,0g
Peptona de carne	5,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,8 ± 0,2

5.4.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 4mL em tubos de ensaio de 12x120mm ou 8mL em tubos de 16x 150mm e tamponar com algodão cardado. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio estiver quente (fundido), colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.4.3 Armazenamento

O meio deve ser armazenado sob refrigeração, ao abrigo da luz, por um período máximo de 15 dias.

Nota: Meios de cultura distribuídos em tubos com tampa de rosca podem ser armazenados por até três meses sob refrigeração.

5.5 Caldo soja e triptona (TSB)

5.5.1 Fórmula:

Triptona.	7,0g
Peptona de soja	3,0g
Dextrose	2,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	2,5g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,3 ± 0,2

5.5.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10mL em tubos de 16x 150mm com tampa de rosca e esterilizar por autoclavação a 121°C, durante 15 minutos.

5.5.3 Armazenamento

O meio contido nos tubos rosqueados deve ser armazenado ao abrigo da luz, sob refrigeração ou à temperatura ambiente (inferior a 30 °C) por no máximo 3 meses.

5.6 Ágar Citrato de Simmons

5.6.1 Fórmula:

Dihidrogeno fosfato de amônio (NH ₄ H ₂ PO ₄)	1,0g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	1,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Citrato de sódio	2,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,2g
Azul de bromotimol	0,08g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,9 ± 0,2

5.6.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 8mL em tubos de 16 x 150mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavação e enquanto o meio estiver quente (fundido), colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.6.3 Armazenamento

O meio deve ser armazenado sob refrigeração, ao abrigo da luz, por um período máximo de 3 meses.

5.7 Caldo triptona 1%

5.7.1 Fórmula:

Triptona	10,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,2.±.0,2

5.7.2 Preparo

Pesar 10g de triptona e acrescentar 1000mL de água purificada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5mL em tubos de 12 x 120mm e tamponar com algodão cardado ou tampas plásticas apropriadas para esse tipo de tubo de ensaio. Esterilizar por autoclavação a 121°C, durante 15 minutos.

5.7.3 Armazenamento

O meio deve ser armazenado ao abrigo da luz, sob refrigeração ou à temperatura ambiente (inferior a 30°C), por no máximo 15 dias.

5.8 Reativo de Kovacs

5.8.1 Fórmula:

p-dimetilaminobenzaldeído	5,0g
Alcool amílico ou isoamílico	75mL
Ácido clorídrico concentrado	25mL

5.8.2 Preparo

Pesar 5,0g de p-dimetilaminobenzaldeído e colocar em um balão volumétrico. Em seguida, adicionar 75mL de álcool amílico ou isoamílico para dissolver o p-dimetilaminobenzaldeído. Acrescentar lentamente, 25mL de HCl. Acondicionar em frasco âmbar ou protegido da luz com tampa rosqueada.

Nota 1: Esse preparo deve ser realizado na capela de segurança química, utilizando-se máscara e luvas de borracha grossas.

Nota 2: O reativo preparado pode ser adquirido comercialmente.

5.8.3 Armazenamento

Armazenar em frasco âmbar ou protegido da luz com tampa rosqueada por três meses sob refrigeração ou, se adquirido comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante.

5.9 Reativo de oxidase

5.9.1 Fórmula:

Cloridrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina	0,10g
Água purificada	100mL

5.9.2 Preparo

Pesar 0,1g de cloridrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina e acrescentar 10mL de água purificada. Em seguida, agitar bem até a completa dissolução do cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina.

5.9.3 Armazenamento

Armazenar em frasco âmbar ou protegido da luz com tampa rosqueada por uma semana sob refrigeração.

5.10 Ágar m-Endo LES

5.10.1 Fórmula:

Extrato de levedura	1,2g
Casitona ou tripticase	3,7g
Tiopeptona ou tiotona	3,7g
Triptose	7,5g
Lactose	9,4g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	3,3g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	3,7g
Desoxicolato de sódio	0,1g
Lauril sulfato de sódio	0,05g
Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃)	1,6g
Fucsina básica	0,8g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,2 ± 0,2

5.10.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria contendo 20mL de álcool etílico a 95%. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 50 - 55°C, em banho-maria. Distribuir volumes de aproximadamente 15mL em placas de Petri de 90x15mm estéreis. Após a solidificação do meio, embalar as placas.

5.10.3 Armazenamento

O meio deve ser armazenado ao abrigo da luz, sob refrigeração, por um período máximo de 15 dias.

5.11 Meio EC

5.11.1 Fórmula:

Triptose ou tripticase	20,0g
Lactose	5,0g
Mistura de sais biliares ou sais biliares nº 3	1,5g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	4,0g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,9 ± 0,2

5.11.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12mm x 120mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 5mL. Tamponar com algodão cardado ou tampas plásticas apropriadas para esse tipo de tubo de ensaio. Esterilizar por autoclavação a 121°C, durante 15 minutos.

5.11.3 Armazenamento

O meio deve ser armazenado ao abrigo da luz, à temperatura ambiente (inferior a 30°C), por no máximo 15 dias.

6 Execução do ensaio

6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para quantificação de *E. coli* baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante, com porosidade de 0,45µm. As bactérias ficarão retidas na superfície da membrana, a qual é então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial (ágar m-TEC modificado), com posterior incubação a 35 ± 0,5°C durante 2 horas, seguida de um período de 22-24 horas a 44,5 ± 0,2°C. Após esse período, efetua-se a contagem das colônias típicas de *E. coli* que crescem neste meio com coloração vermelha a magenta.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia nacional de coleta e preservação de amostras (CETESB/ANA, 2011).

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 amostras que se supõe menos contaminadas a soma dos volumes filtrados deve ser no mínimo 100mL; e
- b) para águas mais contaminadas pode ser requerida a filtração de volumes decimais da amostra.

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"), o qual é conectado a um frasco Kitasato, que por sua vez é conectado a um frasco kitasato de proteção e esse à fonte de vácuo ou a um garrafão reforçado para vácuo em polipropileno apresentando tampa com sistema de enchimento;
- b) placas de Petri de 49x13mm contendo o meio ágar mTEC modificado, identificadas com o número 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 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 ou frascos de 1000 mL e frascos para diluição (volume de 90 ± 2 mL); e
- g) membranas filtrantes mistas de acetato e nitrato de celulose (ou acetato de celulose somente) estéreis, com 47mm de diâmetro, porosidade de 0,45 μ m, brancas quadriculadas.

6.3.4 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, com a face quadriculada voltada para cima, centralizando-a 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; e
- c) para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição estéril antes da filtração das amostras e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para a filtração

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 10mL:

- a) homogeneizar a amostra, por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e antebraço) e agitando vigorosamente; repetir a operação no mínimo 25 vezes; e
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas, ou 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); e
- b) homogeneizar e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra), efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:

- a) proceder à marcação de cada frasco de água de diluição estéril, anotando o número da amostra e a diluição que deverá conter;

b) homogeneizar a amostra como descrito em **6.3.5.1.a** e, com uma pipeta estéril de 10mL e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,1mL de amostra;

c) repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo diluição feita anteriormente (10^{-1}), e desta, com uma nova pipeta estéril de 10mL, transferir 10mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,01mL da amostra; e

d) proceder dessa maneira na sequência das diluições desejadas de acordo com o grau de contaminação da amostra (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-8}).

6.3.5.4) Com o auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume de 1mL da cada diluição e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição (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). Homogeneizar e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação

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

6.3.6.2 Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração.

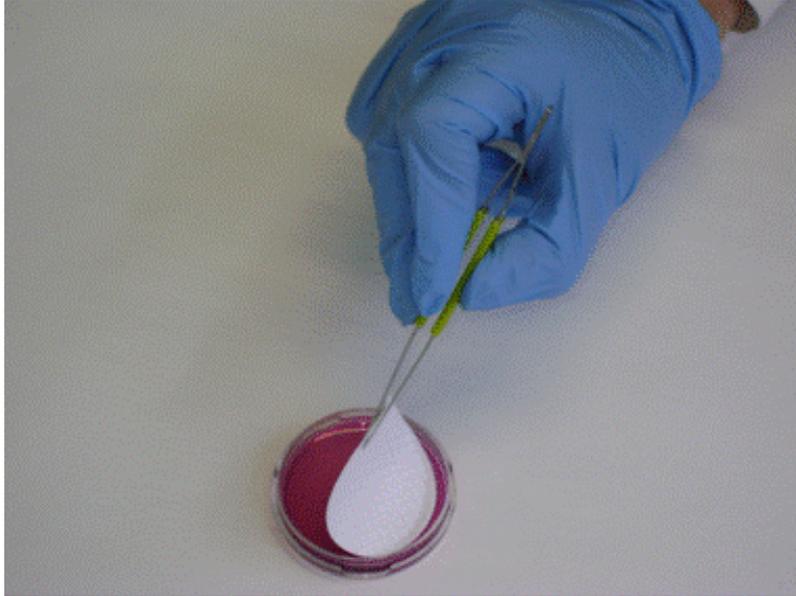
6.3.6.3 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro três vezes com porções de 20-30mL de água de diluição estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

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.

Nota: 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 (figura 2).

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

FONTE: CETESB

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.

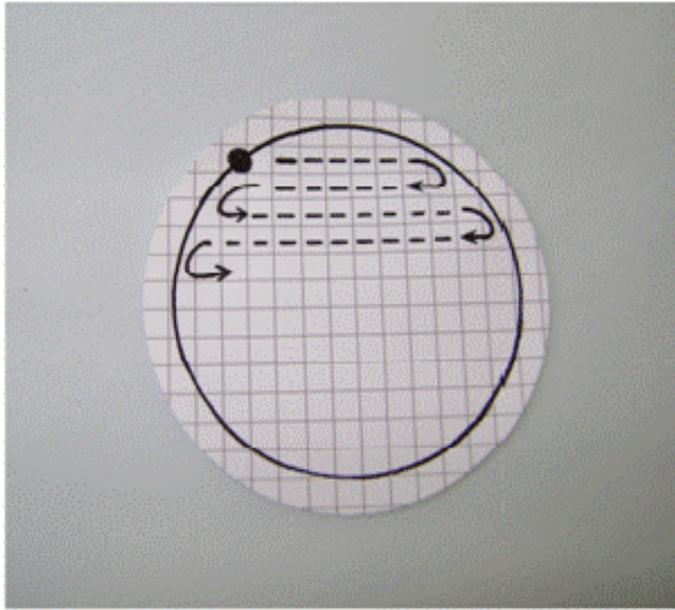
Nota: Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtração e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, devem ser esterilizados novamente ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental

6.3.6.9 Após as filtrações, incubar as placas em posição invertida a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, e em seguida a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou incubadora jaqueta d'água durante 22 a 24 horas. Se a incubação for realizada em banho-maria, as placas de Petri devem ser colocadas em sacos plásticos bem vedados e mantidas totalmente submersas na água, durante o período de incubação.

6.3.7 Leitura

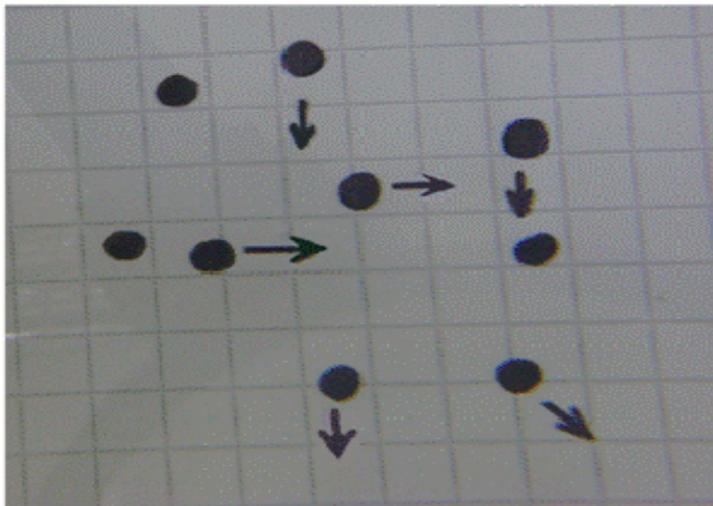
6.3.7.1 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico (com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias típicas de *E. coli* que apresentem coloração vermelha ou magenta (rosa escuro).

6.3.7.2 Os limites ideais para a contagem de colônias típicas de *E. coli* em ágar mTEC modificado situam-se entre 20 e 80 colônias, sendo que a contagem total (colônias típicas e atípicas) deve ser inferior a 200. Para efetuar a contagem, observar as figuras 3 e 4.

Figura 3 – Modelo pra contagem das colônias

FONTE: CETESB

Nota: O círculo interno indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem.

Figura 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento

FONTE: CETESB

Nota: As colônias são contadas nos quadrados indicados pelas setas

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.

6.3.7.4 Quando os volumes filtrados (soma dos volumes maior ou igual a 100mL) não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo **item 7.2.3**.

6.3.7.5 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, e a soma dos volumes correspondentes for 100mL, efetuar a leitura em todas essas placas e utilizar a soma das contagens para o cálculo.

6.3.7.6 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas e a soma desses volumes não for 100mL, selecionar para leitura o volume cuja contagem for mais próxima do intervalo ideal para a contagem e expressar o resultado como densidade estimada.

6.3.7.7 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens superiores a 80, mas for possível contar as colônias no menor desses volumes, utilizar a contagem dessas colônias nesse volume para o cálculo e expressar o resultado como densidade estimada.

6.3.7.8 Se dois diferentes volumes filtrados fornecerem placas com a contagem na faixa ideal, utilizar essas duas contagens e volumes para o cálculo.

6.3.7.9 Quando a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200 em todos os volumes filtrados, 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, ou considerar para cálculo e expressão dos resultados os **itens 7.1.3 e 7.2.4**.

7 Resultado

7.1 Cálculo

7.1.1 A partir da contagem de colônias vermelhas ou magentas em ágar mTEC modificado, selecionar a placa que apresentar contagens dentro da faixa ideal (20 a 80) e calcular a densidade de *E. coli* por meio da seguinte fórmula:

$$E. coli / 100mL = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas}}{\text{Volume filtrado de amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado conforme **item 6.3.7.5** e **6.3.7.8**, calcular a densidade em 100mL através da seguinte fórmula:

$$E. coli / 100mL = \frac{\text{Soma das colônias típicas}}{\text{Soma dos volumes correspondentes (mL)}} \times 100$$

7.1.3 – Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem 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 cálculo da densidade de *E. coli* em 100mL e **item 7.2.2** para expressão dos resultados.

7.1.4 Nos casos em que todas as placas referentes aos volumes filtrados apresentarem números de colônias superiores a 200, considerar o valor de 80 colônias no menor volume filtrado, utilizar a fórmula geral apresentada no **item 7.1.1** para cálculo dos resultados e o **item 7.2.4** para expressão dos resultados.

7.1.5 Nos casos em que todas as placas referentes aos volumes filtrados apresentarem números de colônias superiores a 200, considerar o valor de 80 colônias no menor volume filtrado, utilizar a fórmula geral apresentada no **item 7.1.1** para cálculo dos resultados e o **item 7.2.4** para expressão dos resultados

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de *E.coli*, determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como:

Unidades formadoras de colônias de *E. coli* /100mL

7.2.2 No caso especificado em 7.1.3, em que todos os volumes filtrados fornecem contagens iguais a zero, mas os mesmos não totalizam 100mL, após o cálculo, expressar o resultado obtido precedido do sinal < (menor que):

Unidades formadoras de colônias de *E. coli* /100mL < valor obtido

7.2.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecem contagens iguais a zero, mas os mesmos totalizam 100mL, expressar o resultado como:

Unidades formadoras de colônias de *E. coli* /100mL < 1 (Ausente)

7.2.4 Quando a contagem não for efetuada devido ao grande número de colônias típicas e / ou atípicas que se desenvolveram na membrana (> 200) ou a ocorrência de crescimento confluyente, o resultado é expresso como:

Unidades formadoras de colônias de *E. coli* > valor obtido/100mL

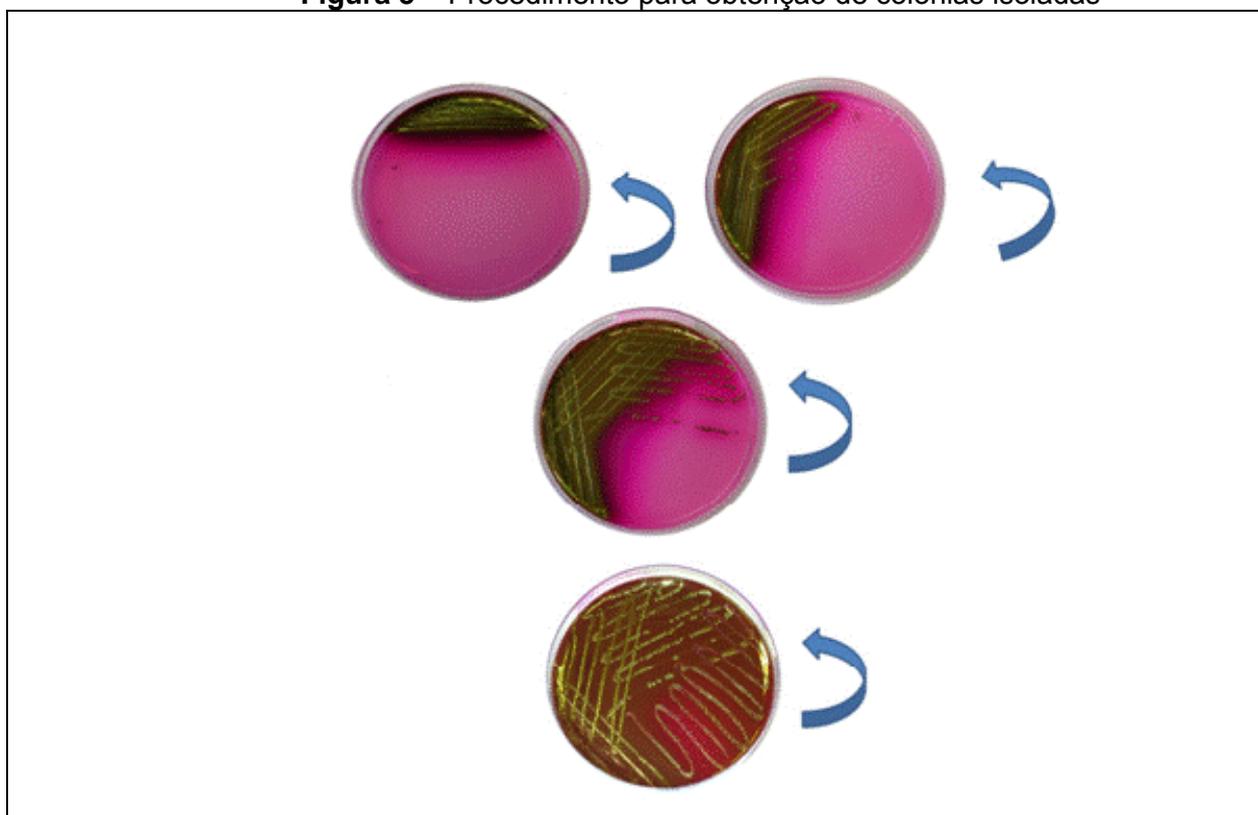
8 Procedimento de verificação para controle de qualidade

A verificação das colônias típicas para *E. coli* em meio m-TEC é recomendada como controle de qualidade e fornecimento de dados para uma avaliação do desempenho do método em relação às amostras analisadas, devendo ser realizada periodicamente.

8.1 A partir das placas de uma determinada amostra, selecionar um número de no mínimo 10 colônias típicas bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de verificação.

8.2 Reisolar cada colônia selecionada em placa de ágar m-Endo LES através de espalhamento em estrias conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Procedimento para obtenção de colônias isoladas



FONTE: CETESB

- a) Com uma alça, flambada e resfriada, colher o inóculo da colônia a ser reisolada;
- b) Depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de agar m-Endo LES, 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;
- c) Girar novamente a placa e continuar o espalhamento no segundo quadrante;
- d) Proceder dessa maneira até completar a semeadura em toda a superfície do ágar; e
- e) Fechar e incubar a placa em posição invertida durante 22 a 24 h a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

8.3 Identificar tubos de agar nutriente e caldo de soja e triptona (TSB) de tal modo que cada colônia reisolada corresponda a um tubo de cada meio.

8.4 Com uma alça de inoculação flambada e resfriada, transferir um inóculo de cada colônia típica para um tubo de ágar nutriente e para um tubo de caldo triptona e soja (TSB) e incubá-los a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

8.5 Pesquisa de oxidase

Após incubação, com uma alça de inoculação de platina, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento em ágar nutriente e tocar em uma folha de papel de filtro previamente colocada no fundo de uma placa de Petri estéril e embebida em uma solução aquosa a 1% 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.

Nota 1: Para controle positivo do teste de oxidase utilizar cultura de *Pseudomonas aeruginosa* e para controle negativo cultura de *E.coli*.

Nota 2: Não deve ser utilizada alça de níquel, o que acarretaria resultados falso-positivos.

8.6 Utilização do citrato como única fonte de carbono

Com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, transferir uma pequena quantidade do crescimento em caldo de soja e triptona para um tubo contendo ágar citrato de Simmons. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Após o período de incubação, considerar como positivas as culturas que apresentarem crescimento e alcalinização do meio, evidenciado pela coloração azul; considerar como negativas as culturas que não cresceram no meio.

8.7 Produção de indol

Com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, transferir uma pequena quantidade do crescimento do caldo de soja e triptona para o caldo triptona. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Após o período de incubação, adicionar 0,5mL de reagente de Kovacs para o teste de indol e agitar levemente o tubo. Efetuar a leitura, considerando como teste positivo o desenvolvimento de uma forte coloração vermelha na camada superficial de álcool.

8.8 Fermentação da lactose a $44,5^{\circ}\text{C}$

Com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, transferir uma pequena quantidade do crescimento em caldo de soja e triptona para um tubo contendo caldo EC. Incubar a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e efetuar a leitura após 24 horas, considerando:

- presença de gás no tubo de Durham: prova positiva;

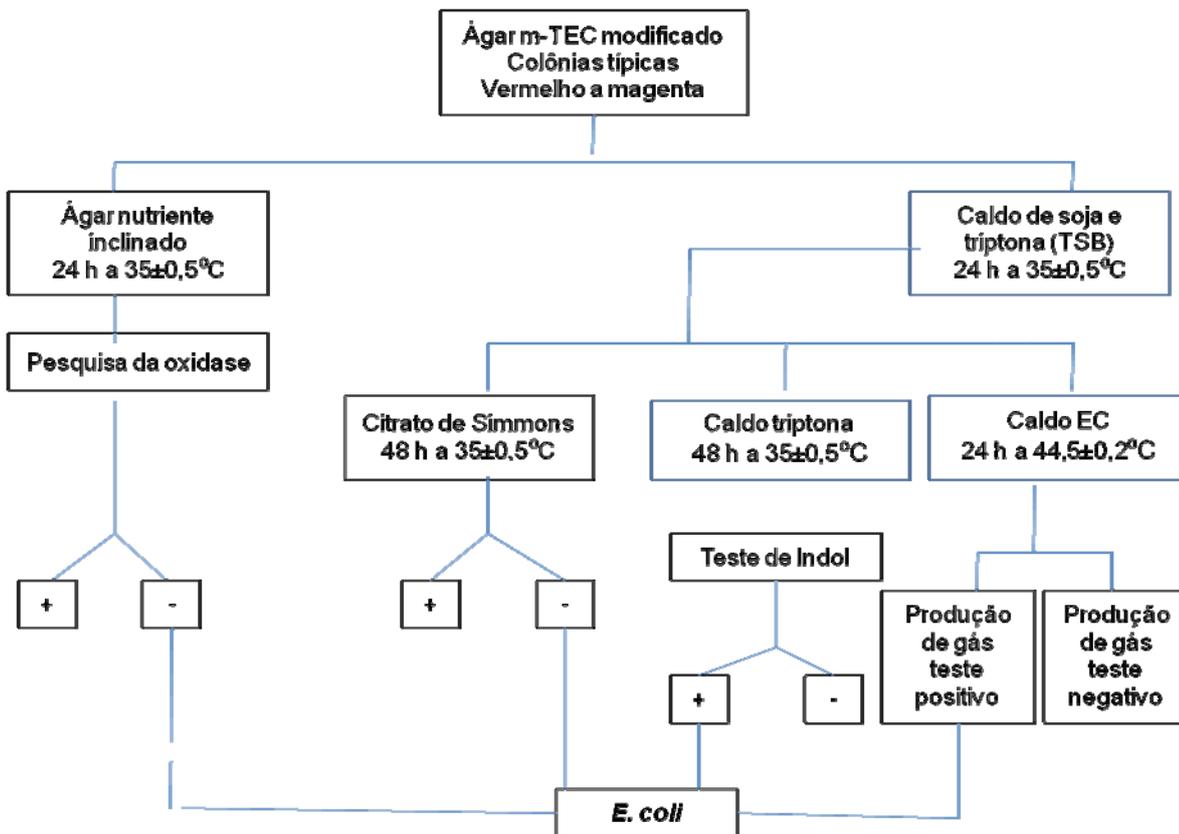
- ausência de gás no tubo de Durham: prova negativa.

8.9 As culturas de *E. coli* devem apresentar, nessas provas bioquímicas, os resultados descritos na Tabela 1 e na Figura 6.

Tabela 1 – Resultados das provas bioquímicas

Prova Bioquímica	Resultado
Oxidase	-
Citrato de Simmons	-
Indol	+
Fermentação da lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$	+

Figura 6 – Sequência de testes confirmativos para *E. coli*



9 Referências

APHA, AWWA, WEF, Section 9213D.3b. Recreational Waters. In: Standard methods for the examination of water and wastewater 22th edition. Washington 2012.

BRASIL. CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, v. 142, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: jul. 2012

CETESB/ANA. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p.

Disponível em:

<<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: jun. 2012.

Edberg, SC, Rice, EW, Karlin, RJ, Allen, MJ. 2000 *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **J. Appl. Microbiol.** **88**: 106S116S.

European Parliament. (2006). Directive 2006/EC of the European Parliament and of the council concerning the management of quality of bathing water. **Official Journal of the European Union.** **I.64**: 37-51, 4/3/2006.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, MR., Lauret, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **J. Microbiological Methods** **49**: 31-54.

Tallon, P., Magajna B., Lofranco C., Leung K. T. 2005 Microbial indicators of faecal contamination in water: a corrent perspective. **Water, Air and Soil Pollution** **166**: 139-66.

WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality, 3rd ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: jun. 2012

United States Environmental Protection Agency. (1986). Ambient Water Quality for Bacteria – 1986. EPA 440/5-84-002. Disponível em: http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/2009_04_13_beaches_1986crit.pdf

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1603: *Escherichia coli* (E. coli) in water by membrane filtration using membrane-thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified m-TEC), EPA 821-R-02-023, setembro 2002.
