



NORMA TÉCNICA

L5.233

Dez/1990
23 PÁGINAS

Bacteriófagos f-específico: método quantitativo em amostras de água e de esgoto: 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;">BACTERIÓFAGOS F-ESPECÍFICOS - MÉTODO QUANTITATIVO EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DE ESGOTO</p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.233</p> <p style="text-align: center;">DEZ/90</p>
--------	---	---

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas e documento complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	3
5 Execução do ensaio.....	10
6 Resultados.....	14
Anexo A - Esquema de procedimento.....	17
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	21
Anexo C - Referências bibliográficas.....	23

INTRODUÇÃO

A distribuição de bacteriófagos, vírus que atacam as bactérias, em diferentes tipos de água vem sendo investigada em vários estudos sobre poluição da água, mas ainda não está bem elucidada.

A detecção de níveis de bacteriófagos na água poluída por esgoto vem sendo proposta por diversos autores como uma forma de avaliar o nível de contaminação dessa água.

Os vírus bacterianos, especialmente aqueles que infectam a E.coli, são frequentemente propostos como indicadores adicionais para assegurar a capacidade virucida dos processos de tratamento de água. De acordo com Havelaar et alii, 1984, os bacteriófagos comumente detectados pela cepa hospedeira E.coli, isto é, os colífagos, são um grupo heterogêneo, com diferentes características de sobrevivência. Já os bacteriófagos RNA de fita simples, ou bacteriófagos F-específicos, pertencentes ao grupo morfológico E, são relativamente homogêneos e são capazes de infectar bactérias E.coli com pili sexual ou F, como também outra bactéria relacionada que possua o plasmídeo F. Eles pertencem à família Leviviridae, têm um diâmetro de 20-27 nm e consistem de uma estrutura simples de RNA envolta por uma capsídeo proteica. A sua estrutura e tamanho são similares a dos enterovírus, sendo esta semelhança uma das principais razões na consideração dos fungos F-específicos como modelos de vírus.

Estudos experimentais têm demonstrado que os bacteriófagos F-especí

ficos são capazes de sobreviver aos processos de tratamento de água e esgoto e são relativamente resistentes à inativação por desinfetantes, tratamento térmico e luz solar.

Várias pesquisas têm sido realizadas para se padronizar métodos de isolamento de fagos para vários tipos de água. Estes métodos incluem filtrações, concentrações, plaqueamento direto e outros e vêm sendo utilizados para determinar a sobrevivência e o destino desses vírus em águas de esgoto e em outros tipos de água, bem como para avaliar a eficiência dos processos de tratamento de água e esgoto na eliminação desses microrganismos. Na metodologia de enumeração de bacteriófagos F-específicos vem sendo correntemente utilizada uma bactéria hospedeira F^+ que permite uma contagem direta dos fagos existentes em uma amostra ambiental através do procedimento do plaqueamento em dupla camada de ágar.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método para determinação de bacteriófagos F-específicos em amostras de água.

2 NORMAS E DOCUMENTO 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
- L5.225 - Determinação de colífagos em amostras de água
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.8.

3.1 Bactéria F^+ ou Hfr

São bactérias que possuem organelas especiais, denominadas pili-F mais longas que os pili ou fímbrias comuns, que parecem constituir o túnel de conjugação, através do qual o DNA da bactéria F^+ é introduzido na bactéria F^- .

3.2 Pili

São finos apêndices filamentosos que se originam em corpúsculos ba

sais localizados na membrana citoplasmática de bactérias, sendo constituídos por proteínas rígidas. Uma das possíveis funções dos pili é a de facilitar a aderência das bactérias em outras células. Os pili-F ou pili sexuais são importantes para que ocorra um dos processos de recombinação genética em bactérias, a conjugação.

3.3 Plasmídeos

São elementos genéticos extracromossomais que possuem a capacidade de se replicar independentemente dos cromossomos bacterianos. Um tipo especial de plasmídeo é aquele que pode replicar em dois estágios alternativos: integrado ou independentemente do cromossomo da bactéria. Como exemplo desse tipo de plasmídeo, pode ser citado o plasmídeo F (importante na conjugação bacteriana). Os plasmídeos contêm informações cujos produtos são dispensáveis para a viabilidade bacteriana e podem ser transmitidos de uma célula para outra.

3.4 RNA

Ácido ribonucleico.

3.5 Placas

Áreas circulares incolores na camada de crescimento bacteriano confluyente, visíveis quando a bactéria hospedeira infectada é lisada.

3.6 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

3.7 p.a.

Para análise.

3.8 q.s.p.

Quantidade suficiente para:

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve ser capaz de acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda a vidraria e aparelhagem que puder ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade 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 e ser equipada com válvula de segurança, manômetro e termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave deve ser normalmente operada a uma pressão de vapor de 105 kPa e produzir, 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 da 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

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com capacidade 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 de temperatura. A incubadora deve 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 para comportar recipientes com meios de cultura.

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 capa

cidade para comportar recipientes com os meios de cultura e soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.9 Congelador

Com regulagem para manter a temperatura abaixo de -70°C . É destinado ao armazenamento das suspensões da bactéria padrão Salmonella typhimurium. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.10 Contador de colônias

Tipo Quebec ou similar, preferencialmente com o campo escuro, ou outro modelo que forneça aumento equivalente (1,5 diâmetros) e possibilite 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 em décimos da capacidade, 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 $170-180^{\circ}\text{C}$, 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 nem bolhas de ar, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.1.17 Bico de Bunsen

4.1.18 Tripé4.1.19 Tela de amianto

De tamanho 22 x 22 cm.

4.1.20 Alça 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 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), aço inoxidável ou arame galvanizado plastificado (para utilização em banho-maria).

4.1.22 Porta-pipetas de aço inoxidável4.1.23 Seringa automática

Tipo Cornwall, de 10 mL.

4.1.24 Alcoômetro4.1.25 Flaconete

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

4.1.26 Algodão hidrófilo4.1.27 Fita crepe4.1.28 Fitas adesivas

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

4.1.29 Papel alumínio4.1.30 Papel Kraft4.1.31 Membrana filtrante

De éster de celulose, com porosidade de 0,22 μ m, com diâmetro de 47 mm.

4.1.32 Porta-filtro

De aço inoxidável, diâmetro de 47 mm.

4.1.33 Pera de sucção ou pipetador de segurança4.1.34 Pinça dente de rato4.1.35 Pincel demarcador

Para escrita em vidro.

4.1.36 Tubos Eppendorf4.2 Meios de cultura e soluções4.2.1 Reagentes

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

- a) ácido clorídrico fumegante (HCl) p.a.;
- b) ácido nalidixico;
- c) ágar;
- d) álcool etílico comercial;
- e) cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- f) cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- g) dextrose;
- h) EDTA p.a.;
- i) extrato de levedura;
- j) glicerol p.a.;
- k) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- l) peptona de soja;
- m) tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.;
- n) triptona.

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

4.2.2 Preparo de meios de cultura4.2.2.1 Caldo com triptona, extrato de levedura e glicoseFórmula:

Triptona.....	8,5 g
Peptona de soja	1,5 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	8,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1000,0 mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.2.2.2 Ágar com triptona, extrato de levedura e glicose a 1,5% (para as placas)

Fórmula:

Triptona.....	8,5 g
Peptona de soja.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	8,0 g
Ágar.....	15,0 g
Solução de cálcio-glicose.....	10,0 mL
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 ou 1N. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar em banho-maria a 48-50°C e acrescentar, em condições de assepsia, 10,0 mL da solução de cálcio-glicose previamente preparada. Distribuir assepticamente, com seringa automática tipo Cornwall, o volume de 20,0 mL em placas de Petri de 15 mm x 10 mm. Armazenar em geladeira.

4.2.2.3 Ágar com triptona, extrato de levedura e glicose a 1,5% (para os tubos)

Fórmula:

Triptona.....	8,5 g
Peptona de soja.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	8,0 g
Ágar.....	15,0 g
Ácido nalidíxico.....	4,0 mL
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Aquecer em banho-maria agitando frequentemente, até a completa dissolução. Em seguida, acrescentar 4,0 mL da solução de ácido nalidíxico. Distribuir volumes de 50,0 mL em erlenmeyers de 125 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Nota: No momento do uso, fundir, estabilizar em banho-maria a 48-50°C e acrescentar 0,5 mL da solução de cálcio-glicose a cada 50,0 mL do meio. Distribuir volumes de 5,5 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm para análise.

4.2.3 Preparo de soluções

4.2.3.1 Solução de ácido clorídrico 1NFórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl) p.a.....	83,5 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

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

4.2.3.2 Solução de ácido nalidíxicoFórmula:

Ácido nalidíxico.....	125 mg
Água destilada.....	4,0 mL

Preparo:

Pesar 125 mg de ácido nalidíxico. Dissolver o reagente com 1,0 mL de hidróxido de sódio 1N. Em seguida, acrescentar 4,0 mL de água destilada.

4.2.3.3 Solução de álcool a 70%Preparo:

A 700,0 mL de álcool etílico comercial acrescentar quantidade de água suficiente (aproximadamente 200,0 a 300,0 mL) para obter uma solução de álcool a 70%. Essa verificação é feita através do uso do alcoômetro.

4.2.3.4 Solução de cálcio-glicoseFórmula:

Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	3,0 g
Glicose.....	10,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 100,0 mL de água destilada fria. Esterilizar por filtração com pressão positiva, utilizando porta-filtro que contenha membrana de éster em celulose com a porosidade de 0,22 μm . Todos os materiais e equipamentos utilizados na filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 15 minutos. Distribuir a solução filtrada em volumes de 25 mL. Armazenar em geladeira.

4.2.3.5 Solução de tiosulfato de sódio a 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..... 1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 18,0 mL de tiossulfato de sódio e dissolver em 1 000,0 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado.

4.2.3.6 Solução de EDTA a 15%Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) p.a..... 150,0 g
 Água destilada q.s.p..... 1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 150,0 g de EDTA e dissolver em 1 000,0 mL de água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado.

4.2.3.7 Solução de hidróxido de sódio 1NFórmula:

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

Preparo:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000,0 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO5.1 Princípio do método

A determinação de bacteriófagos em uma amostra baseia-se no princípio de que, definindo condições de nutrição, hospedeiro, temperatura e tempo de incubação, se houver fagos na água, haverá formação de placas que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para tal, volumes adequados da amostra são inoculados, juntamente com a cultura da bactéria hospedeira Salmonella typhimurium, em placas de Petri contendo meio de cultura específico. Os bacteriófagos infectam e se multiplicam na bactéria sensível e, após um período de incubação de 18-24 horas a 35°C formar-se-ão áreas circulares de descontinuidade do crescimento bacteriano (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.

5.2.1.4 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.

5.3 Procedimento

5.3.1 Preparação da cultura bacteriana hospedeira

Para a execução da análise de bacteriófagos F-específicos em amostras de água é utilizada como bactéria hospedeira a Salmonella typhimurium phage type 3 NaI^r (F'42 lac:: Tn 5), que deve ser preparada conforme descrito nos itens 5.3.1.1 a 5.3.1.5.

5.3.1.1 A partir de uma ampola liofilizada, colher o inóculo da cultura estoque de Salmonella typhimurium e transferi-la para 50 mL de caldo com triptona, extrato de levedura e glicose.

5.3.1.2 Incubar esse meio a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante a noite.

5.3.1.3 Após o período de incubação e obedecendo aos cuidados de assepsia, acrescentar 10,0 mL de glicerol no frasco que contém 50 mL de caldo de triptona, extrato de levedura e glicose.

5.3.1.4 Homogeneizar a suspensão bacteriana e, com uma pipeta esterilizada, transferir volumes de 0,5 mL dessa suspensão para tubos Eppendorf ou flaconetes estéreis e tamponar. Durante o tempo de distribuição manter a suspensão bacteriana em banho de gelo.

5.3.1.5 Estocar em congelador a -70°C .

5.3.2 Realização do ensaio

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

5.3.2.2 Para o início da análise proceder da seguinte maneira:

- a) Descongelar o tubo com a bactéria hospedeira Salmonella typhimurium;
- b) Transferir 0,5 mL da cultura bacteriana para 50 mL de caldo com triptona, extrato de levedura e glicose;
- c) Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 a 3 horas, sob agitação constante, até obter uma densidade óptica de 0,5 a 520 nm (essa medida é equivalente a 1×10^9 bactérias/mL). As leituras da densidade óptica devem ser realizadas em

- espectrofotômetro previamente calibrado com ealdó esté
ril;
- d) manter a suspensão bacteriana, assim obtida, em banho de gelo, durante o teste;
- e) fundir um erlenmeyer com 50 mL de ágar com triptona, ex
trato de levedura e glicose a 1,5% e estabilizá-lo em ba
nho-maria a 48-50°C. Acrescentar assepticamente, 0,5 mL da solução de cálcio-glicose;
- f) dispor em uma estante, 4 tubos estéreis de 16 mm x 150 mm e estabilizá-los em banho-maria a 48-50°C. Transferir 5,5 mL do meio de cultura descrito no item anterior para cada um dos tubos, mantendo em banho-maria durante o teste;
- g) efetuar a marcação de 4 placas de Petri contendo ágar com triptona, extrato de levedura e glicose a 1,5% anotando, nas tampas das placas, o número designado pelo laborat
ório na ficha de registro de exames, o tipo de água e a diluição, se utilizada;
- h) homogeneizar a amostra por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e antebraço). Repetir vigorosamente a operação no mínimo 25 vezes;
- i) para amostras que contenham menos que 1000 colifagos/100,0 mL homogeneizar segundo o item 5.3.2.2-h e proceder à inocu
lação conforme descrito em 5.3.2.3;
- j) para amostras que contenham mais de 1000 colifagos/100,0 mL efetuar diluições decimais com água destilada estéril, pro
cedendo da seguinte forma:
- anotar em cada frasco de água destilada estéril, o núme
ro da amostra e a diluição que deverá conter;
 - homogeneizar a amostra (como em 5.3.2.2-h) e, com uma pipeta estéril de 10,0 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10,0 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo $90,0 \pm 2,0$ mL de água destilada estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma cor
responderá ao volume de 0,1 da amostra;
 - repetir a operação segundo o item anterior, com o fras
co contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e des
ta, com uma nova pipeta estéril de 10,0 mL, transferir

10,0 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo $90,0 \pm 2,0$ mL de água destilada estéril. Prepara-se assim a 2ª diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1,0 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 5.3.2.3.

5.3.2.3 Com uma pipeta esterilizada de 5,0 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 5,0 mL da amostra ou da diluição apropriada para cada um dos 4 tubos de ágar com triptona, extrato de levedura e glicose a 1,5%.

5.3.2.4 Com pipeta de 1,0 mL, inocular cada um dos tubos com 1 mL da bactéria hospedeira Salmonella typhimurium.

5.3.2.5 Homogeneizar lentamente o conteúdo dos tubos e verter cada um deles em placas de Petri, contendo ágar com triptona, extrato de levedura e glicose a 1,5%.

5.3.2.6 Homogeneizar cada placa de Petri com movimentos em forma de oito (∞), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o ágar com o inóculo na tampa da placa.

5.3.2.7 Após a solidificação do ágar, incubar as placas em posição invertida, a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

5.3.2.8 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.

6 RESULTADOS

6.1 O número de bacteriófagos F-específicos é obtido multiplicando-se por 5 a somatória da contagem das placas de lise nas 4 placas de Petri utilizadas. O resultado é expresso em unidades formadoras de placa (UFP) por 100,0 mL da amostra.

Exemplo:

Placas de Petri	I	II	III	IV	Total
Placas de lise	4	5	9	6	= 24

Cálculo:

$$24 \times 5 = 120 \text{ placas}/100,0 \text{ mL}$$

6.2 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, considerando ter sido utilizada a diluição decimal 10^{-1} , o resultado final será 1 200 placas/100,0 mL (120 multiplicando pelo fator de diluição 10).

/ANEXO A

ANEXO A - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO

As figuras A1, A2, e A3 mostram um esquema de procedimento para aplicação do método.

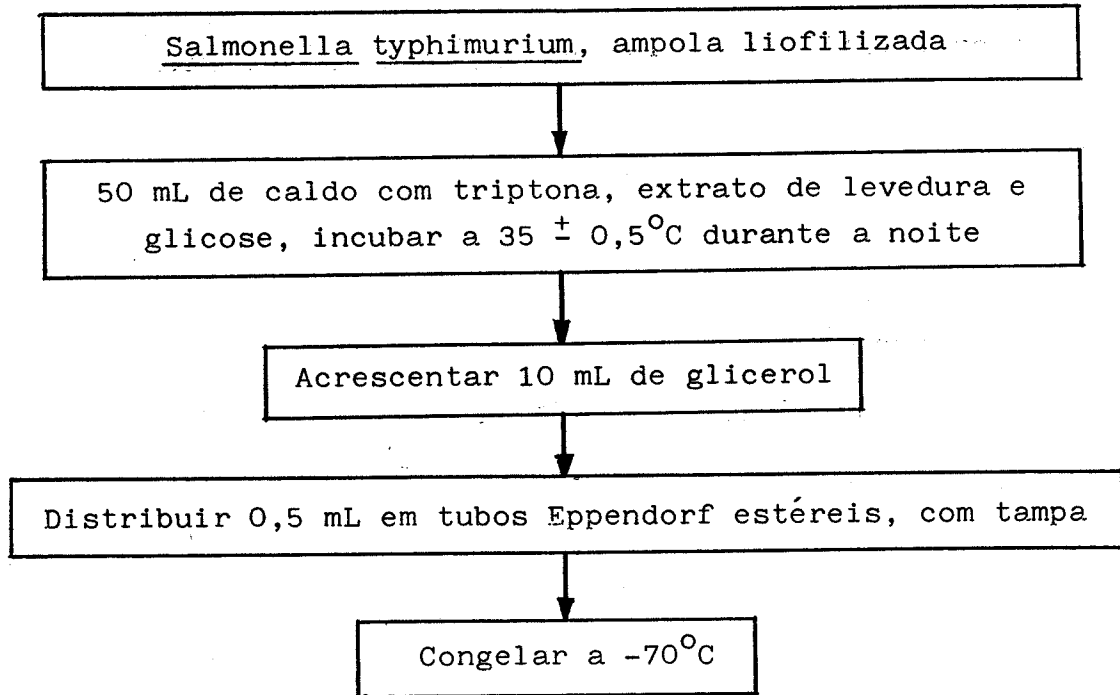


Figura A₁ - Fluxograma da preparação da suspensão bacteriana estoque

/FIGURA A₂

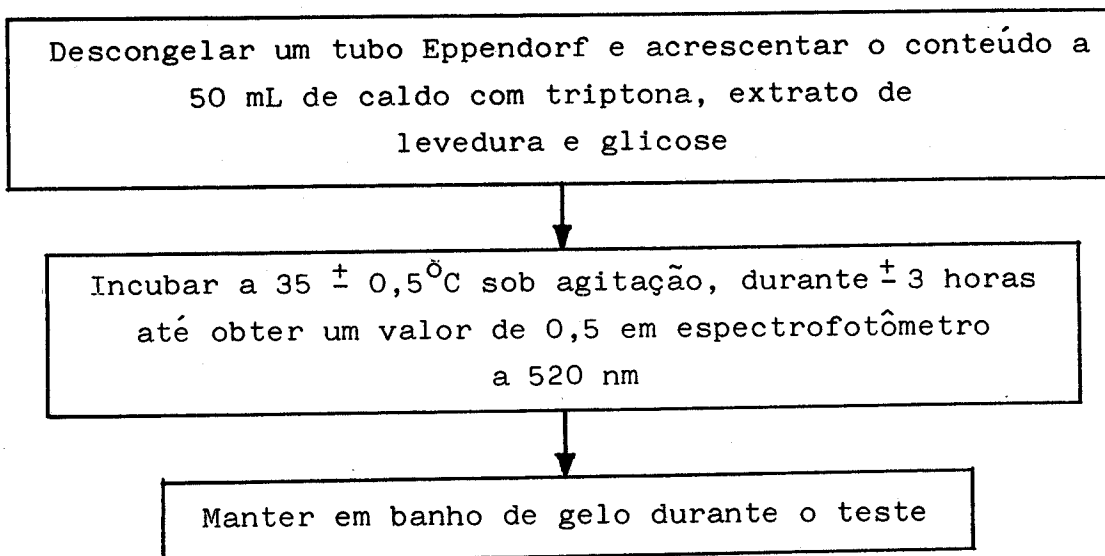


Figura A₂ - Fluxograma da preparação da suspensão bacteriana no momento do uso

/FIGURA A₃

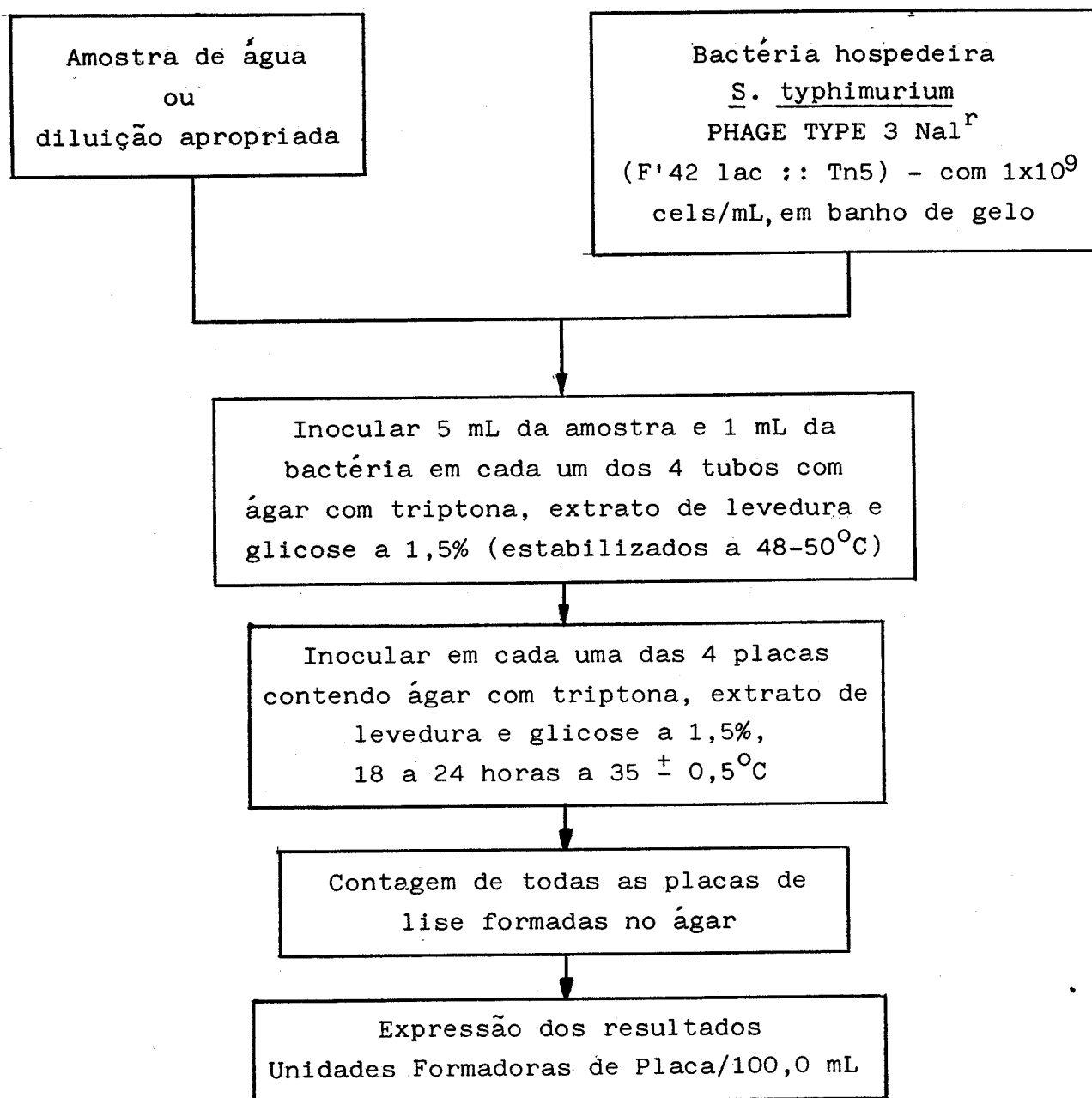


Figura A₃ - Fluxograma da realização do ensaio

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALB-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

B-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 que contém os meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação 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, isto significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-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 a sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de ensaios específicos. Ver norma CETESB L5.215.

B-4 Cuidados no preparo dos meios de cultura

B-4.1 O ágar utilizado nos meios de cultura deve ser o purificado; especial para análises microbiológicas.

B-4.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água fria, principalmente para os meios que contêm ágar, pois, se for utilizada água quente, formar-se-á imediatamente em torno de cada partícula de ágar uma película que protegerá 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 de molho os meios que contenham ágar durante 15 minutos em água destilada fria, agitando a mistura frequentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que o seu conteúdo para facilitar a homogeneização.

B-5 Controle de qualidade dos meios de cultura

B-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 su

primir ou inibir o crescimento bacteriano, ou possibilitar a ocorrência de reações inespecíficas.

B-5.2 Antes e após a esterilização, deve-se determinar o pH de cada partida de meio de cultura preparado, anotando seu valor, a data e o número de controle do lote. Esta determinação é fundamental, pois há a possibilidade de ocorrência de erro na pesagem, aquecimento excessivo e contaminação química.

B-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.

B-6 Precauções

B-6.1 Ao fundir o ágar de soja 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 temperatura elevada durante e após a fusão;
- c) fundir quantidade do meio superior à que será usada.

/ANEXO C

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-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.
- C-2 ADAMS, M.H. Bacteriophages. Interscience Public Inc. New York, 1959.
- C-3 BIER, O., Bacteriologia e Imunologia. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1978. p. 103 a 117.
- C-4 BURAS, N. & KOTT, Y. Bacteriophage as an indicator for the estimation of water pollution. Israel J. Med.Sci., 2: 660, 1966.
- C-5 CETESB. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986.1ª revisão (Norma Técnica M1.001).
- C-6 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985.1ª revisão (Norma Técnica L5.215).
- C-7 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (Norma Técnica L5.216).
- C-8 _____. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1982, 201 p.
- C-9 HAVELAAR, A.H. & HOGEBOM, W.M. Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage polluted waters. Antonie van Leeuwenhoek, 49: 387-397, 1983.
- C-10 HAVELAAR, A.H. & HOGEBOM, W.M. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bacteriol. 56: 439-447, 1984.
- C-11 HAVELAAR, A.H. & HOGEBOM, W.M. F-specific RNA - bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological Aspects. Wat.Sci.

Tech., 20: 399-407, 1988.

- C-12 HILTON, M.C. & STOZKY, G. Use of coliphages as indicators of water pollution. Can. J. Microbiol., 19: 747-751, 1973.
- C-13 KOTT, Y.; ROZE, N.; SPERBER, S. & BETZER, N. Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Res., 8: 165-171, 1974.
- C-14 KOTT, Y. Bacteriophages as sewage pollution indicators. Presented in a Seminar on "Microbiological Indicators of Pollution and Health Hazards". São Paulo, 1978.
- C-15 MARQUES, E.; SANTOS, V.W.; SATO, M.I.Z.; MARTINS, M.T. & SANCHEZ, P.S. A study of F-specific bacteriophages and somatic coliphages in seawater and shellfish, Brazil. Proceedings Second Biennial Water Quality Symposium: Microbiological Aspects. 1990, p. 243-246.
- C-16 PRIMROSE, S.B. & DAY, N. Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol., 42: 417-421, 1977.
- C-17 SCARPINO, P. Bacteriophage indicators. In: BERG, G., Indicators of viruses in water and food. Ann Arbor Science Publishers. Inc., Ann Arbor, MI, 201, 1978.
- C-18 SCOTT, W.M.; O'NEILL, P.E.; WILKINSON, M.J. & KITCHENS, J. F. Evaluation of coliform bacteria and bacteriophage relationships in assessment of water quality. Final Technical Report NSF Grant nº PFR78-19196. December, 1979.
- C-19 SEELEY, N.D. & PRIMROSE, S.B. Concentration of bacteriophages from natural water. J. Appl. Bacteriol., 46: 103-116, 1979.
- C-20 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.
-