



NORMA TÉCNICA

L5.403

Jun/2004
23 PÁGINAS

Clostridium perfringens: determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante - 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

Clostridium perfringens
**DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA PELA
TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE**
(Método de ensaio)

L5.403
jun/2004

**ANEXO ÚNICO A QUE SE REFERE O ARTIGO 1º DA DECISÃO
DE DIRETORIA Nº 089/2004/E, DE 11 DE AGOSTO DE 2004.**

NORMA TÉCNICA L5.403
(Versão Junho/2004)

SUMÁRIO

Página

Introdução.....	01
1. Objetivo.....	02
2. Documentos complementares.....	02
3. Definições.....	02
4. Aparelhagem.....	03
5. Meios de cultura e soluções.....	07
6. Execução do ensaio.....	10
7. Resultados.....	17
8. Testes bioquímicos complementares para confirmação de <i>Clostridium perfringens</i>	19
9. Referências bibliográficas.....	22

Introdução

Clostridium perfringens tem sido utilizado como indicador bacteriológico de contaminação fecal, pois sua incidência no meio aquático está constantemente associada a despejos humanos, sendo sua presença detectada nas fezes, esgotos e águas poluídas.

Por serem esporuladas, estas bactérias apresentam grande resistência aos desinfetantes e às condições desfavoráveis do meio ambiente e a excepcional longevidade de seus esporos na água é útil na detecção de contaminação fecal remota, em situações em que outros indicadores menos resistentes, como *Escherichia coli* já não estão mais presentes.

A pesquisa de *Clostridium perfringens* é recomendada como um complemento valioso a outros testes bacteriológicos de avaliação da qualidade da água, particularmente em certas situações específicas, entre as quais se incluem a análise de águas cloradas e águas não tratadas contendo resíduos industriais letais as bactérias não esporuladas e de amostras de lodos de esgoto. Nas situações em que é desejável a detecção, tanto de poluição fecal remota como recente, bem como em estudos de sobrevivência de indicadores, é de importância também a pesquisa deste indicador.

A técnica de membrana filtrante tem sido utilizada com considerável sucesso por permitir a quantificação de bactérias em água com eficiência e rapidez. A combinação de alta temperatura de incubação com o uso de antibióticos específicos no meio de cultura, veio permitir a recuperação

relativamente simples de células vegetativas ou esporos de *Clostridium perfringens* através dessa técnica.

1. Objetivo

Esta Norma prescreve a Técnica de Membrana Filtrante, utilizada na determinação de *Clostridium perfringens*, com aplicação na:

- avaliação da qualidade de águas tratadas ou brutas destinadas ao consumo humano;
- avaliação da qualidade de águas brutas contendo resíduos industriais letais a outros microrganismos indicadores;
- avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas;
- avaliação da eficiência de processos de tratamento de esgoto, na remoção de microrganismos;
- avaliação da qualidade de águas minerais;
- avaliação da qualidade da água utilizada na fabricação de produtos alimentícios;
- detecção de contaminação fecal remota.

2. Documentos Complementares

Para fins de utilização dessa Norma, devem ser consultados os seguintes documentos:

Normas técnicas CETESB:

- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB, 1988.
- L5.216 – Controle de qualidade de meios de cultura - Método de Ensaio.
- M1.001–Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia – Procedimento.

3. Definições

3.1. *Clostridium perfringens*

São bacilos curtos Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios, imóveis esporogênicos (esporos ovais, com localização central ou subterminal). Não possuem catalase; fermentam a lactose com abundante produção de gás e também a sacarose, mas não a celobiose. Realizam fermentação turbulenta do leite. Produzem lecitinase, gelatinase e fosfatase ácida; reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H₂S) e o nitrato a nitrito. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento é de 45° C, podendo crescer entre 20 e 50 °C.

3.2. Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma de bastão.

3.3. Esporos

Célula de repouso formada por certos microrganismos sob condições desfavoráveis. Os esporos não apresentam atividade metabólica e são muito mais resistentes a agentes físicos e químicos do que as células de origem.

4. Aparelhagem

4.1. Equipamentos

4.1.1. Balança.

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g. As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura.

4.1.2. Banho-maria.

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme ($60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para atingir a altura do nível da amostra contida no frasco de coleta.

4.1.3. Destilador de água ou aparelho para desionização.

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA – Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water, 1997).

4.1.4. Equipamentos para esterilização.

4.1.4.1. Autoclave.

Deve ter 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.¹

4.1.4.2. Estufa para esterilização.

Deve manter a temperatura de 170 a 180°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

4.1.5. Equipamentos para filtração.

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

4.1.5.2. Frasco Kitassato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada ou suporte especial para os porta-filtros.

4.1.5.3. Frasco para proteção, com capacidade adequada, 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.

4.1.5.4. Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável (**ver figura 1**).

¹ 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.

4.1.6. Incubadora bacteriológica (44,5°C)

Deve manter a temperatura na faixa de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de $0,1^{\circ}\text{C}$ e estar imerso em líquido.

4.1.7. Incubadora bacteriológica (35°C)

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de $0,5^{\circ}\text{C}$ ou menos e estar imerso em líquido.

4.1.8. Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH

4.1.9. Microscópio estereoscópio binocular.

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

4.1.10. Refrigerador.

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C . O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de 1°C ou menos.

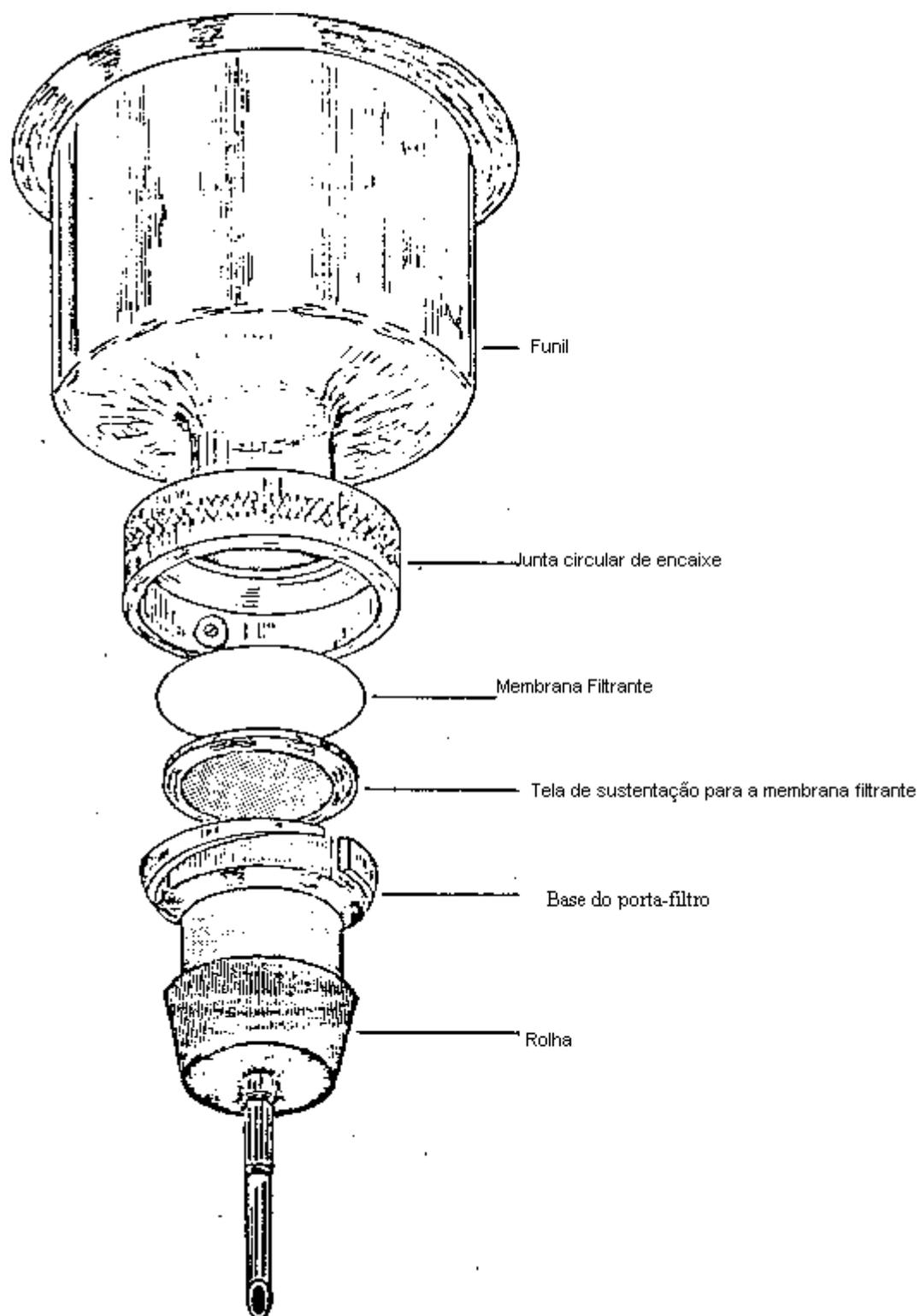


Figura 1 – Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração

4.2. Vidraria

4.2.1. Balões.

De borossilicato ou de vidro neutro, 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 à prova de vazamento.

4.2.3. Provetas.

Graduadas (100mL) ou porta-filtros graduados com marcação externa, com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4. Frasco para água de diluição.

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

4.2.5. Pipetas.

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

4.3. Outros materiais

4.3.1. Sistema de anaerobiose

Constituído de jarra anaeróbica, câmara de reação, gerador descartável de hidrogênio e dióxido de carbono e indicador de anaerobiose ou qualquer outro sistema capaz de produzir condições anaeróbicas adequadas para o crescimento dos microrganismos.

4.3.2. Bicos de Bunsen ou similar.

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

4.3.3. Caixas ou cestas de aço inoxidável.

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.4. Estojo para pipetas.

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

4.3.5. Membrana filtrante.

Com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis.

4.3.6. Pinças.

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.7. Placas de Petri.

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

4.3.8. Recipientes para preparação de meios de cultura.

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

4.3.9. Termômetros.

Devem ter escala adequada ao uso e a coluna de mercúrio não deve apresentar interrupções. Também podem ser utilizados termômetros eletrônicos digitais, desde que apresentem faixa, sensibilidade e exatidão adequadas.

4.3.10. Papel de filtro.

De forma circular, com 11cm de diâmetro, Whatman 40 ou 110, ou equivalente, para separar as placas do ágar mCP durante a incubação anaeróbia.

5. Meios de Cultura e Soluções**5.1. Ágar mCP modificado****5.1.1. Fórmula:**

Triptose.....	30,0 g
Extrato de levedura.....	20,0 g
Sacarose.....	5,0 g
L-cisteína.....	1,0 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO ₄ . 7H ₂ O).....	0,1 g
Púrpura de bromocresol.....	0,04 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	900mL
pH final após esterilização:	7,6 a 25° C

5.1.2. Preparo.

Pesar os componentes e acrescentar 900mL de água destilada fria. Deixar 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. Ajustar o pH para 7,6. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Após autoclavação, estabilizar a temperatura do meio a 50°C em banho-maria e adicionar os seguintes componentes:

- a) D-cicloserina.....0,4 g
- b) Sulfato de polimixina.....0,025 g
- c) Indoxil - β - D - glucosídeo
Dissolver 0,06g em 80,0mL de água destilada (solução 0,075%). Esterilizar por filtração. Adicionar este volume ao meio preparado.

d) Difosfato de fenoltaleína

Preparar uma solução a 0,5% em água destilada e esterilizar por filtração. Adicionar 20mL desta solução ao meio preparado.

e) Cloreto férrico hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Preparar uma solução de cloreto férrico a 4,5%. Esterilizar por filtração. Adicionar 2mL desta solução ao meio preparado.

A seguir, distribuir assepticamente volumes de 4 – 4,5mL em placas de Petri de 49mm x 13mm, estéreis.

5.1.3. Armazenamento.

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

5.2. Meio de leite com ferro modificado**5.2.1. Fórmula:**

Leite desnatado.....	100g
Sulfato de ferro heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,0g
Água destilada	1000mL

5.2.2. Preparo:

Dissolver o sulfato de ferro em 50mL de água destilada. Pesar o leite desnatado e adicioná-lo, vagarosamente, à água destilada sob agitação e sem aquecimento, para sua completa dissolução. Distribuir volumes de 11mL em tubos de ensaio de 18 x 180mm. Autoclavar a 118°C durante 12 minutos.

5.2.3. Armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante no máximo, duas semanas.

5.3. Caldo tioglicolato**5.3.1. Fórmula:**

L-cistina.....	0,5 g
Cloreto de sódio (NaCl)	2,5g
Dextrose.....	5,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
Triptona	15,0g
Tioglicolato de sódio	0,5g
Resazurina	0,001g
Ágar	0,75 g
Água destilada.	1000 mL
pH final após a esterilização:	7,1±0,1

5.3.2. Preparo:

Pesar 29,25g do meio desidratado “Fluid Thioglycollate Medium” e acrescentar 1000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio. Distribuir 15mL do meio em tubos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.3.3. Armazenamento:

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante, no máximo, duas semanas.

5.4. Água de diluição**5.4.1. Fórmula:**

Solução estoque A	1,25mL
Solução estoque B	5,0mL
Água destilada	1000mL

5.4.2. Preparo:

a) Preparar a solução estoque A com a seguinte composição:

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	34,0g
Água destilada	1000mL

Preparo: dissolver o dihidrogeno fosfato de potássio em 500mL de água destilada. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. 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 em geladeira;²

b) Preparar a solução estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio hexaidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O).....	81,1g
Água destilada	1000mL

Preparo: dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada e completar o volume para 1000mL com água destilada. 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 em geladeira;

c) Adicionar 1,25mL da solução estoque A e 5mL da solução estoque B a um litro de água destilada;

d) Distribuir quantidades que assegurem, após autoclavação, volumes de 90 ± 2 mL em frascos com tampa de rosca³; e

² Antes da utilização da solução estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

³ A água de diluição a ser utilizada no enxágüe de porta-filtros, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização por autoclavação do volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 a 1000 mL).

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

5.5. Solução de hidróxido de sódio 1N

5.5.1 Fórmula:

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

5.5.2. Preparo:

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

6. Execução do Ensaio

6.1. Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para quantificação de *Clostridium perfringens* baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante, com porosidade de 0,45µm . Essas bactérias, apresentando dimensões maiores que o poro da membrana, ficarão retidas em sua superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial Ágar mCP. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias; após um período de 24 h de incubação a 44,5 ± 0,2°C em anaerobiose, se desenvolverão colônias com características típicas (coloração amarelo palha). A sacarose e o indoxil β-D glucosídeo presentes no Ágar mCP são os componentes que permitem a diferenciação dessa bactéria. A fermentação da sacarose é evidenciada pela coloração amarelo palha das colônias, devido à viragem do indicador de pH (púrpura de bromocresol) e a hidrólise do indoxil β- D glucosídeo, pela coloração azul das mesmas. Como *Clostridium perfringens* fermenta a sacarose, mas não fermenta a celobiose (glicose β-D glucosídeo) não hidrolisando o indoxil β-D glucosídeo, suas colônias apresentam-se com coloração amarela nesse meio. Após o período de incubação, a membrana contendo as colônias típicas em sua superfície, é submetida ao teste para fosfatase ácida através da exposição a vapores do hidróxido de amônio durante 10-30 segundos. O Ágar mCP contém o difosfato de fenolftaleína em sua composição e, como *Clostridium perfringens* é capaz de produzir a enzima fosfatase ácida, que determina a hidrólise dessa substância, com liberação de fenolftaleína, as colônias típicas desta bactéria irão apresentar uma coloração rosa escuro ou magenta, após exposição a vapores de hidróxido de amônio. A partir da contagem destas colônias, calcula-se a densidade de *Clostridium perfringens* na amostra analisada.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB; 1988).

6.3 Desenvolvimento do ensaio

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

- a) Para águas destinadas ao consumo humano, é recomendável a análise de um volume mínimo de 100mL da amostra, o qual é filtrado diretamente no caso de águas de boa qualidade, ou subdividido em volumes menores, dependendo do grau de contaminação fecal que pode estar presente.
- b) Para outros tipos de água, incluindo águas superficiais marinhas ou doces, pode ser requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra), dependendo do grau de contaminação fecal presente.

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

6.3.3 Disponibilizar sobre a bancada os seguintes materiais:

- a) Porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao frasco de filtração (ou ao suporte especial), o qual é conectado a um frasco de segurança e este à fonte de vácuo;
- b) Placas de Petri, contendo o meio Ágar mCP, identificadas com o número da amostra e o volume a ser filtrado;
- c) Pinças com as extremidades mergulhadas em álcool etílico contido em um béquer;
- d) Bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;
- e) Provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra. Podem ser utilizados porta-filtros graduados com marcação externa, desde que os mesmos apresentem erro volumétrico inferior a 2,5%;
- e) Água de diluição estéril, contida em balões identificados com o número dos porta-filtros, para cujo enxágüe serão utilizados; e
- f) Membranas filtrantes estéreis, com 47mm de diâmetro, 0,45µm de porosidade, brancas e quadriculadas.

6.3.4. Preparação do porta-filtro:

- a) Retirar a parte superior do porta-filtro 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; e
- b) Acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana.

c) Para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição tamponada estéril no início de cada série de filtração e após 10 filtrações no mesmo porta-filtro.

6.3.5 Preparação da amostra para a filtração:

Aquecer as amostras em banho-maria a $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, para eliminação de organismos não esporulados e formas vegetativas, esfriando-as imediatamente após em água fria.

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 20mL:

a) Homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de cerca de 45° entre o braço e o antebraço.

b) Distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas estéreis e proceder à filtração como no **item 6.3.6**.

6.3.5.2 Para volumes inferiores a 20mL:

a) Homogeneizar a amostra conforme descrito no **item 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 bactérias que possam estar presentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração; e

b) Homogeneizar e proceder à filtração como no **item 6.3.6**.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra):

a) Efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:

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

- Homogeneizar a amostra como no **item 6.3.5.1.a** e, com uma pipeta estéril de 10mL, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo $90 \pm 2\text{mL}$ 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 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 10mL, transferir 10mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo $90 \pm 2\text{mL}$ 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;

- Proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , ... 10^{-8} , ...); e

b) Após o preparo das diluições e homogeneização da diluição selecionada para a filtração conforme **item 6.3.5.1.a** retirar o volume desejado com uma pipeta estéril e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as

bactérias que possam estar presentes na amostra, distribuam-se uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração). Homogeneizar e proceder a filtração como no **item 6.3.6**.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação:

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

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

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

6.3.6.4 Desligar a fonte de vácuo, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante.

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

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

Observação: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça, previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar um movimento giratório da mesma, 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, levantar a borda da membrana mais próxima à bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo, seu crescimento.

6.3.6.7 Tampar a placa de Petri.

6.3.6.8 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril, segundo **item 6.3.6.3** e proceder a filtração da próxima amostra.⁴

6.3.6.9 Após as filtrações, remover as tampas das placas e colocá-las, em posição invertida e empilhadas, dentro da jarra de anaerobiose. Colocar as respectivas tampas apoiadas sobre o fundo das placas para facilitar a identificação das mesmas, separando-as com um papel de filtro estéril. Em seguida colocar o sistema gerador de anaerobiose e o indicador de anaerobiose e seguir as instruções recomendadas pelo fabricante para a sua utilização.

6.3.6.10 Incubar a jarra contendo as placas a temperatura de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

⁴ Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtração e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os mesmos devem ser esterilizados novamente, ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental.

6.3.7 Leitura

6.3.7.1 Após o período de incubação, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias presuntivas positivas de *Clostridium perfringens*, que apresentarem coloração amarelo palha (sacarose +, celobiose -), 1 a 3mm de diâmetro, formato convexo e bordas lisas, levando-se em conta as seguintes observações:

6.3.7.2 Os limites aceitáveis para a contagem se situam entre 20 e 80 colônias típicas.

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

6.3.7.4 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, não considerar o limite mínimo e efetuar a leitura em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amostra. Considerar a observação do **item 7.1.1** para o cálculo dos resultados.

6.3.7.5 Quando todos os volumes filtrados apresentarem contagens iguais a zero, expressar os resultados segundo o **item 7.2.4**.

6.3.7.6 Quando a estimativa visual do total de colônias for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), a contagem não é efetuada, sendo os resultados relatados conforme o **item 7.2.3**.

6.3.7.7 Efetuar a pesquisa da enzima fosfatase ácida, expondo a placa aberta com as colônias típicas a vapores de hidróxido de amônio, durante 10 a 30 segundos.

6.3.7.8 Considerar como colônias presuntivas de *Clostridium perfringens* aquelas que adquirirem uma coloração rosa-escuro ou magenta (fosfatase ácida positiva). Contar estas colônias.

6.3.8 Procedimento de confirmação

Devido à seletividade do meio Ágar mCP, uma contagem presuntiva é normalmente utilizada para análises de rotina, entretanto, se desejado, efetuar o procedimento de confirmação das colônias, conforme descrito a seguir:

6.3.8.1 Selecionar um número de 10 colônias típicas bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de confirmação;

6.3.8.2 Identificar tubos de caldo tioglicolato, de tal modo que cada colônia corresponda a um tubo e, com o auxílio de uma agulha de inoculação, devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo de cada colônia para o tubo correspondente e incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas;

6.3.8.3 Avaliar a pureza da cultura de *Clostridium perfringens* no caldo tioglicolato, através da coloração de Gram (pequenos bacilos gram-positivos);

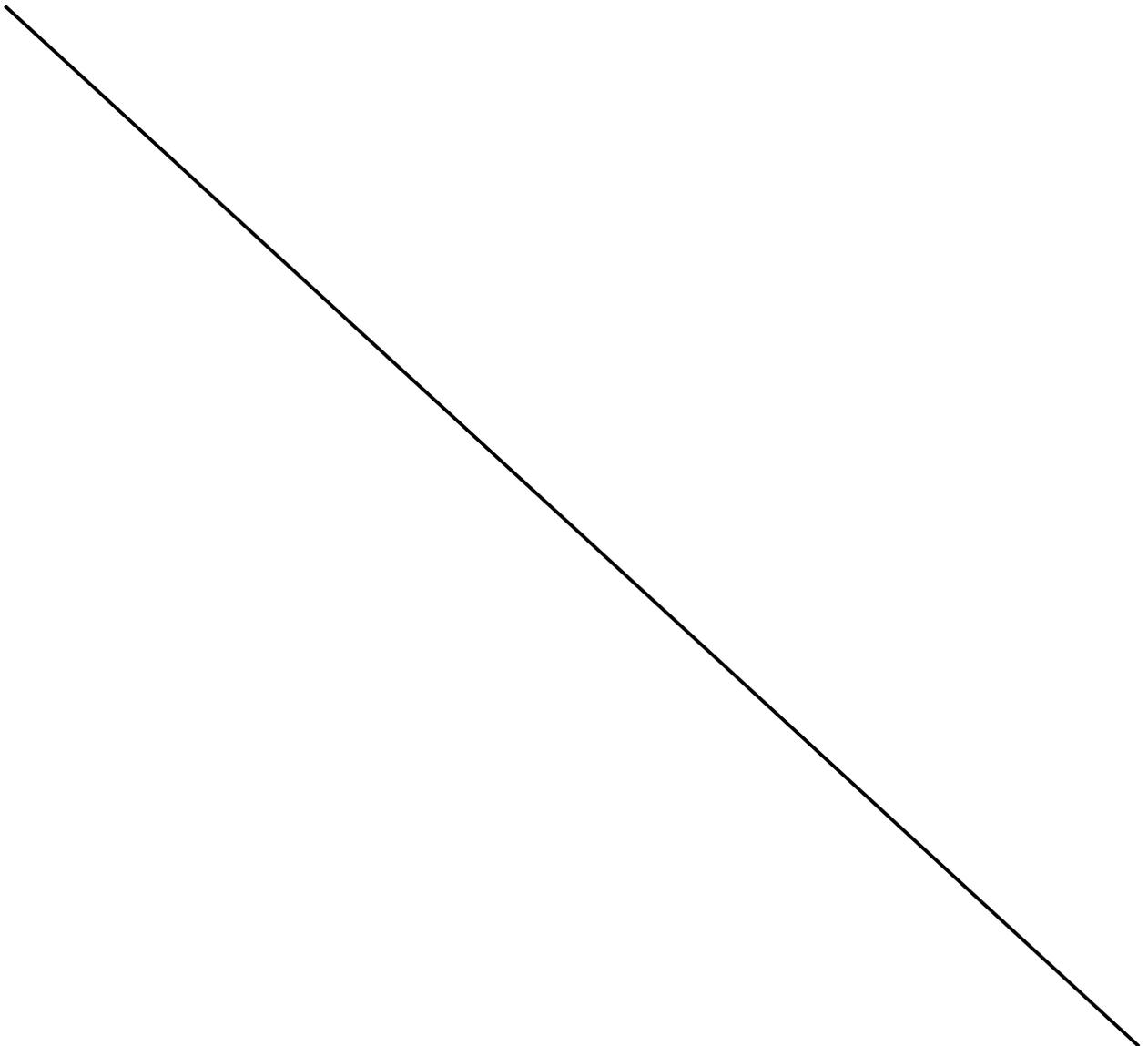
6.3.8.4 Inocular 1mL de todos os tubos que apresentarem crescimento no caldo tioglicolato em tubos contendo o meio de leite com ferro, devidamente identificados, e incubar a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 2 horas;

6.3.8.5 Efetuar a leitura, considerando positivos todos os tubos que apresentem fermentação turbulenta do leite com rápida formação de coágulos; e

6.3.8.6 Considerar como resultado confirmativo para *Clostridium perfringens* as colônias que apresentem as seguintes características: bacilos gram-positivos e produção de fermentação turbulenta do leite.

Observações:

- O esquema de procedimento até o teste confirmativo é apresentado na **figura 2**.
- O procedimento para realização de testes bioquímicos complementares está descrito no **item 08**



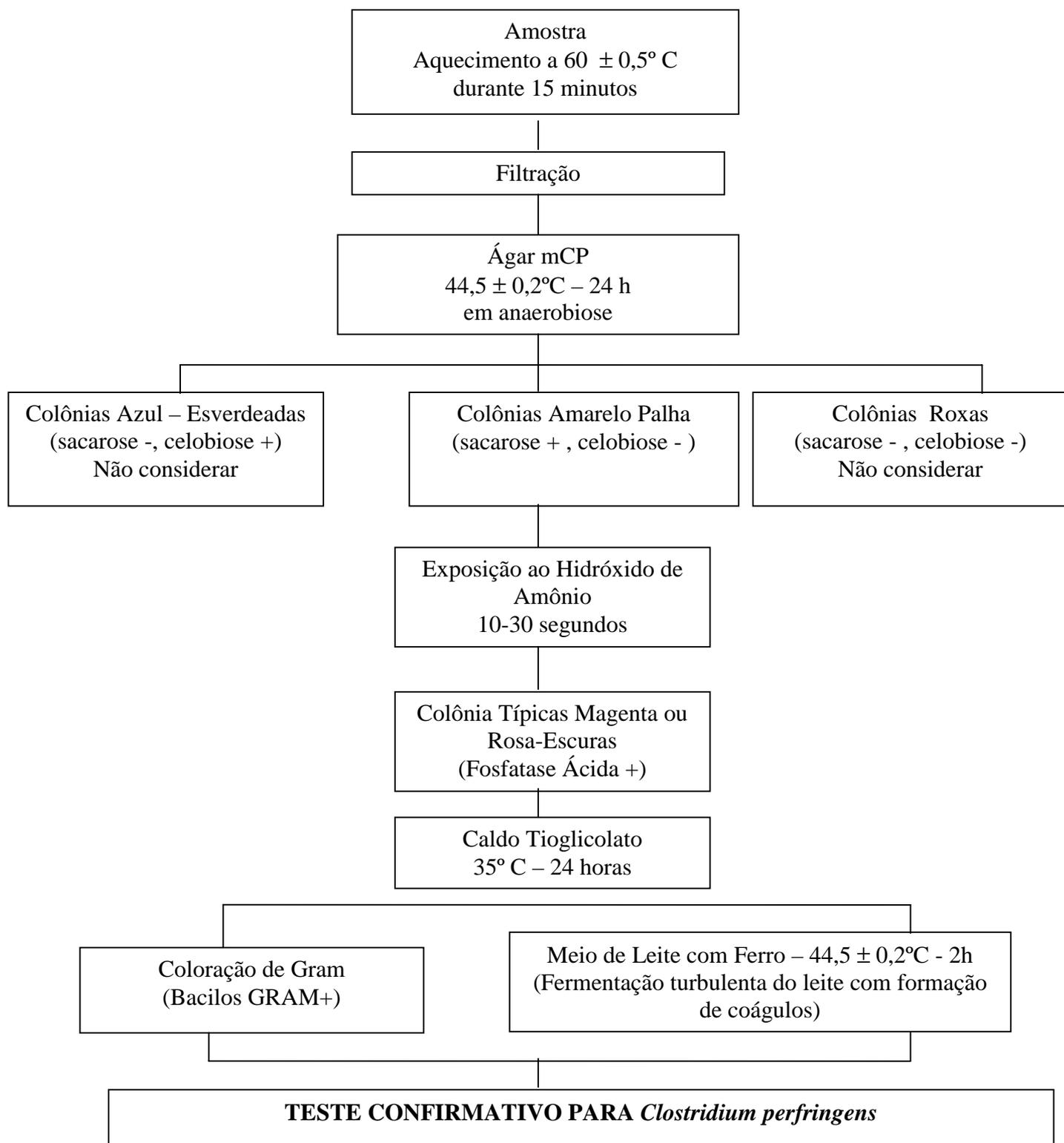


Figura 2 – Esquema de procedimento para determinação de *Clostridium perfringens* pela técnica de membrana filtrante.

7. Resultados

7.1 Cálculo

7.1.1 Se não foi requerida a realização dos testes confirmativos, a partir da contagem das colônias positivas no teste de fosfatase ácida, calcular a densidade de *Clostridium perfringens* em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Clostridium perfringens}/100\text{mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias positivas no teste de fosfatase ácida}}{\text{Volume filtrado da amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2. Se as contagens em todos os volumes filtrados forem inferiores a 20 colônias típicas, considerar as contagens totais efetuadas em todas as placas (incluindo as que forem igual a zero) correspondentes aos volumes filtrados. Calcular a densidade em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Clostridium perfringens}/100\text{mL} = \frac{\text{Soma das colônias de Clostridium perfringens}}{\text{Soma dos volumes correspondentes às contagens (mL)}} \times 100$$

7.1.3 Se forem realizados os testes confirmativos, há dois casos a serem considerados:

7.1.3.1 Quando todas as colônias típicas, na placa selecionada para a leitura, forem submetidas à confirmação. Neste caso calcular a densidade em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula;

$$\text{Clostridium perfringens}/100\text{mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias confirmadas como Clostridium perfringens}}{\text{Volume filtrado da amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.3.2 Quando apenas uma parcela das colônias típicas em Ágar mCP for submetida à confirmação, há dois casos a serem considerados:

a) Quando a porcentagem de confirmação for 100%, calcular a densidade de *Clostridium perfringens* através da aplicação da fórmula apresentada no **item 7.1.1**.

b) Quando a porcentagem de confirmação for menor que 100%, aplicar inicialmente a fórmula apresentada a seguir para o cálculo do nº total de colônias confirmadas:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas} \times \text{n}^\circ \text{ de colônias confirmadas}}{\text{N}^\circ \text{ de colônias submetidas à confirmação}}$$

A seguir, calcular a densidade de *Clostridium perfringens*, aplicando-se a fórmula apresentada no **item 7.1.3.1**.

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de *Clostridium perfringens*, a partir do nº de colônias positivas no teste de fosfatase ácida (magenta ou rosa-escuras), é expressa como:

Unidades formadoras de colônias (UFC) presuntivas de *Clostridium perfringens* /100mL

Observação: A contagem presuntiva é normalmente utilizada para monitoramento de rotina.

7.2.2 A densidade de *Clostridium perfringens* a partir do nº de colônias típicas com resultado confirmativo positivo (porcentagem de colônias confirmadas), é expressa como:

Unidades formadoras de colônias (UFC) confirmadas de *Clostridium perfringens* /100mL

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

Contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

Observação: Nestes casos, solicitar nova coleta da amostra e selecionar volumes mais adequados para a filtração, visando obter contagens dentro dos limites aceitáveis (20 a 80 colônias típicas).

7.2.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, expressar o resultado como:

Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Clostridium perfringens* / 100mL: < 1 (ausente)

8. Testes Bioquímicos Complementares para Confirmação de *Clostridium perfringens*

Para aplicação nos casos em que for requerida a confirmação das colônias de *Clostridium perfringens*, proceder como descrito a seguir.

Observações:

- Todos os meios de cultura utilizados na verificação das colônias de *Clostridium perfringens* devem ser preparados em tubos de ensaio com tampa de rosca. Imediatamente antes do uso, esses tubos devem ser fervidos durante aproximadamente 10 minutos, para exclusão do ar existente no meio, sendo, a seguir, resfriados rapidamente em água de torneira.
- Observar que, sendo o *Clostridium perfringens* um anaeróbio obrigatório, todas as inoculações devem ser feitas em profundidade.

8.1 A partir da cultura pura em caldo tioglicolato, verificada através de coloração de Gram (pequenos bacilos Gram +), efetuar o teste para a pesquisa de catalase e testes para verificação de: motilidade, redução do nitrato, fermentação da lactose e liquefação da gelatina.

8.1.1 Teste para pesquisa de catalase:

Com uma pipeta Pasteur estéril ou uma alça de inoculação flambada e resfriada, transferir um inóculo para uma lâmina de vidro e, sobre o mesmo, adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. A ausência de bolhas constitui teste de catalase negativo, indicando a provável presença de *Clostridium perfringens*.

8.1.2 Testes para motilidade e redução do nitrato

8.1.2.1 Para a execução destes testes são necessários os seguintes meios e soluções:

a) Meio nitrato-motilidade

Fórmula:

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Nitrato de potássio (KNO ₃)	1,0g
Ágar	1,0g
Água destilada	1 000mL
pH final :	7,0 ± 0,2

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Deixar em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,0 ± 0,2. Distribuir em tubos de tampa de rosca até 2/3 de sua capacidade. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

b) Reagentes para o teste de redução do nitrato

1. **Solução A:** Reativo de ácido sulfanílico

Fórmula:

Ácido sulfanílico	8,0g
Ácido acético 5N	1 000mL

2. Solução B: Reativo de naftilamina**Fórmula:**

Alfa-naftilamina	5,0g
Ácido acético 5N	1 000mL

A obtenção do ácido acético 5N consiste na adição de 1 parte do ácido acético glacial para 2,5 partes de água destilada. Estocar os reagentes em frascos escuros.

8.1.2.2 Procedimento para realização dos testes:

a) Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril ou uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, inocular em profundidade no meio nitrato-motilidade uma porção do crescimento de cada cultura pura do caldo tioglicolato. Incubar a 35°C em anaerobiose durante 18-24 horas.

b) Após o período de incubação, efetuar a leitura, considerando:

b.1) Teste de motilidade: considerar como resultado confirmativo para *Clostridium perfringens* neste teste, o crescimento bacteriano restrito à linha de inoculação da cultura em teste (motilidade negativa).

b.2) Teste de redução do nitrato: adicionar 0,5mL das soluções A e B ao meio e, após 1 a 2 minutos, efetuar a leitura. Considerar como teste positivo o desenvolvimento de uma coloração vermelha no meio de cultura.

8.1.3 Testes para fermentação da lactose e liquefação da gelatina.**8.1.3.1** Para a execução destes testes são necessários os seguintes meios e soluções:**a)** Meio lactose-gelatina**Fórmula:**

Triptose.....	15,0g
Extrato de levedura.....	10,0g
Lactose.....	10,0g
Monohidrogeno fosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄).....	5,0g
Vermelho de fenol	0,05g
Gelatina	120,0g
Água destilada	1 000mL
pH final:.....	7,5

Preparo:

Dissolver os componentes, exceto a gelatina e o vermelho de fenol, em 1000mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 7,5. Adicionar a gelatina e o vermelho de fenol e aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir 13mL em tubos de tampa de rosca. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Os tubos podem ser armazenados sob refrigeração durante 1 mês.

8.1.3.2 Procedimento para realização dos testes:

a) Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril ou uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, inocular no meio lactose-gelatina uma porção das culturas puras do caldo tioglicolato. Incubar a 35°C durante 18-24 horas.

b) Após o período de incubação, efetuar a leitura, considerando:

b.1) Teste de fermentação da lactose: considerar como resultado positivo a acidificação do meio, evidenciada pela viragem do indicador de pH, (vermelho de fenol) para amarelo;

b.2) Teste de liquefação da gelatina: colocar os tubos durante 1 hora em geladeira e efetuar a leitura. Considerar como culturas positivas aquelas em que o meio não volta a se solidificar após esse período (hidrólise positiva).

8.2 As culturas de *Clostridium perfringens* devem apresentar, nessas provas bioquímicas, os resultados apresentados no quadro abaixo:

Catalase	-
Motilidade	-
Redução do nitrato	+
Fermentação da lactose	+
Liquefação da gelatina	+

9. Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20.ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 1998.

ARMON, R.; PAYMENT, P. A modified mCP medium for enumerating *Clostridium perfringens* from water samples. **Can. J. Microbiol.** v. 34, p. 78-79, 1988

BISSON, J.W.; CABELLI, V.J. Membrane filter enumeration method for *clostridium perfringens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington; v. 37, n.1, p.55-66, 1979.

_____. *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. **J. Water Pollut. Control. Fed.**, Washington; v. 52, n. 2, p. 241-248, 1980.

BLAZEVIC, D.J.; EDERER, G.M. **Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology**. New York, John Wiley & Sons. 1975, 136p.

BURGER, J.S., NUPEN, E.M.; GRABOW, W. O. K. Evaluation of four growth media for membrane filtration counting of *Clostridium perfringens* in water. **Water SA**, Pretoria; v.10, n. 4, p. 185-188, 1984.

CABELLI, V.J. *Clostridium perfringens* as a water quality indicator. In: HOADLEY, A.W. ; DUTKA, B.J. (ed). **Bacterial indicators/health hazards associated with water**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 1977, p. 65-79.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, 1988. 150 p.

_____. **L5.216**: controle de qualidade de meios de cultura: método de ensaio. São Paulo, 1987. 36p. (Norma técnica)

_____. **M1.001**: lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia: procedimento. São Paulo, 1986 . 34p. (Norma técnica)

HAUSCHILD, A.H.W.; HILSHEIMER, R. Enumeration of food-borne *Clostridium perfringens* in egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar. **Appl. Microbiol.**, Washington; v. 27, n. 3, p. 521-526, 1974.

SARTORY, D.P. Faecal clostridia and indicator bacteria levels in an eutrophic impoundment. **Water SA**, Pretoria; v. 14, n. 2, p. 115-117, 1988.

SHAHIDI, S.A ; FERGUSON. A. R. New quantitative, qualitative and confirmatoriz media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. **Appl. Microbiol.** , v. 21, p. 500-506, 1971.

SNEATH, P.H.A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci: genus *Clostridium* Prazmowski 1880 - 23^{AL}. In: SNEATH, P.H.A et alii (ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, v. 2: sec. 13, p. 1141-1200.

SORENSEN, D.L.; EBEL. S.G.; DICKA, R. A. *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. **Water Res.**, Oxford; v. 23, n. 2, p. 191-197. 1989.

UNITED STATES OF AMERICA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Membrane filter method for *Clostridium perfringens*. In: _____. **ICR microbial laboratory manual**. Cincinnati, Ohio, 1996. Section XI (EPA/600/R-95/178).

_____. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water.** Cincinnati, Ohio, 1997. Chapter V (EPA 815-B-97-001).