



# NORMA TÉCNICA

L5.212

2ª Edição  
Junho 2012  
19 páginas

## **Enterococos – Determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio**

Enterococcus - Procedure for membrane filtration technique: Testing Method

Prescreve o método para quantificação de enterococos pela técnica de membrana filtrante, com aplicação na avaliação da qualidade de águas recreacionais doces, marinhas e estuarinas, na avaliação da qualidade de águas destinadas ao consumo humano e na avaliação da qualidade de águas minerais e águas naturais engarrafadas.

Analise bacteriológica, Análise da água,  
membrana filtrante

*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>

© CETESB 2012

---

**Primeira Edição**

Junho/2007, homologada pela Decisão de Diretoria – DD. nº. 032/93/N, de 19/07/93.

**Segunda Edição**

Junho/2012, homologada pela Decisão de Diretoria – DD. nº. 010/13/E, de 16/01/2013. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v. 123, n. 13, de 19/01/12, Poder Executivo, Seção I, p. 46 a 50.

© CETESB 2012

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

<b>Sumário</b>	<b>página</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Escopo</b> .....	<b>3</b>
<b>3 Documentos complementares</b> .....	<b>3</b>
<b>4 Materiais</b> .....	<b>3</b>
<b>5 Meios de cultura e soluções</b> .....	<b>7</b>
<b>6 Execução do ensaio</b> .....	<b>11</b>
<b>7 Resultado</b> .....	<b>16</b>
<b>8 Procedimento de verificação para controle de qualidade</b> .....	<b>17</b>
<b>9 Referências</b> .....	<b>18</b>

**1 Introdução**

Os enterococos ou enterococos intestinais são um subgrupo dos estreptococos fecais considerados indicadores de contaminação fecal específicos de animais de sangue quente. Taxonomicamente pertencem ao gênero *Enterococcus*, e, como fazem parte da flora intestinal normal de humanos e de animais, geralmente estão presentes em ambientes aquáticos poluídos com esgoto, embora também já tenham sido isolados de plantas, resíduos de animais e solo (FUJIOKA et al., 1999; KÜHN et al., 2003; MÜLLER et al., 2001; WHO, 2003).

*Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as espécies predominantes em fezes humanas e esgoto, mas também estão presentes em fezes animais em proporções variáveis. Alguns estudos indicam variações na distribuição de espécies de enterococos em populações de diferentes regiões geográficas (BLANCH et al., 2003; FISHER; PHILLIPS., 2009; KÜHN et al., 2003).

Esses micro-organismos são cocos Gram-positivos isolados ou em cadeias, negativos para o teste da enzima catalase, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em 6,5% de NaCl, em 40% de sais biliares, em pH 9,6 e em temperaturas de 10°C e 45°C. Os enterococos intestinais apresentam algumas vantagens em relação a outros indicadores de contaminação fecal, como a habilidade de sobreviver por mais tempo na água e em ambientes com maior salinidade e a maior resistência à dessecação e ao cloro.

Estudos mais recentes têm demonstrado a correlação positiva entre as densidades de enterococos e a incidência de doença gastrointestinal em indivíduos expostos a águas recreacionais doces e marinhas, sugerindo a eficácia dessas bactérias como indicadores da potencial presença de micro-organismos patogênicos entéricos (PRÜSS, 1998; WADE et al., 2003, 2006, 2010; WIEDENMANN et al., 2006; USEPA, 2009).

Os enterococos são utilizados, principalmente, na avaliação da qualidade microbiológica das águas recreacionais, sendo que no caso de águas marinhas, são recomendados como indicadores microbiológicos preferenciais pela agência ambiental dos Estados Unidos e pela Organização Mundial de Saúde (USEPA, 2004; WHO, 2003). A Regulamentação Federal brasileira também inclui os enterococos como um dos padrões de qualidade de águas recreacionais marinhas.

Na avaliação da qualidade das águas de consumo, os enterococos podem ser utilizados como indicadores suplementares na investigação de fontes potenciais de contaminação, como deficiências do tratamento da água ou da integridade do sistema de distribuição (WHO, 2011). Para águas minerais e naturais engarrafadas, os enterococos são adotados como critério de qualidade na União Européia e também no Brasil.

## 2 Escopo

Esta Norma prescreve o método para quantificação de enterococos pela técnica de membrana filtrante, com aplicação na:

- a) avaliação da qualidade de águas recreacionais doces, marinhas e estuarinas;
- b) avaliação da qualidade de águas destinadas ao consumo humano;
- c) avaliação da qualidade de águas minerais e águas naturais engarrafadas.

## 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. 5<sup>th</sup> Edition. EPA 815-R-005-04. January 2005. Disponível em: [http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/manual\\_labcertification.pdf](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

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 Banho – maria

Equipado com termostato para temperatura de 50 a 55°C ou 44 a 46°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição ou da adição de suplementos termolábeis.

#### 4.1.3 Destilador ou purificador de água

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

#### 4.1.4 Equipamentos para esterilização

##### 4.1.4.1 Autoclave

Deve ter a capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C, durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.

**Nota:** As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

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

#### 4.1.5. Equipamentos para filtração

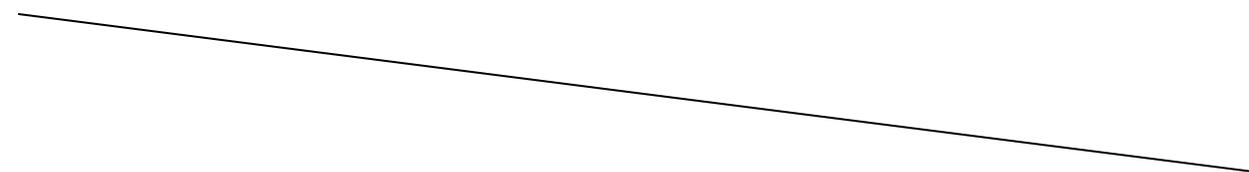
4.1.5.1 Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5atm.

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

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

4.1.5.3 Frasco Kitasato para proteção da fonte de vácuo, 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.

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



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

4.1.5.5. Conjunto de filtração a vácuo estéril com membrana filtrante de 0,22 $\mu$ m para esterilização de soluções.

#### 4.1.6 Incubadora bacteriológica (41°C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida (41  $\pm$  0,5°C). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 0,5°C e estar imerso em líquido.

#### 4.1.7 Incubadora bacteriológica (35°C)

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

#### 4.1.8 Incubadora bacteriológica (10°C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida (10  $\pm$  0,5°C). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 0,5°C e estar imerso em líquido.

#### 4.1.9 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.

#### 4.1.10 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 a capacidade adequada para armazenar meios de cultura, reagentes, soluções ou amostras que necessitam de refrigeração. O termômetro utilizado para o controle da temperatura deve ter 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 vidro borossilicato neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade adequada para conter 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 borossilicato neutro ou de plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125mL, boca larga e tampa à 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 vidro borossilicato neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter  $90 \pm 2$  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 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.

#### 4.3.2 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 acondicionamentos de materiais a serem esterilizados.

#### 4.3.4 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, de platina-irídio ou de 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.

#### 4.3.5 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 e 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, bem vedadas, de 49mm de diâmetro x 13mm de altura.

#### 4.3.9 Recipientes para preparação de meios de culturas

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

#### 4.3.10 Termômetros

Os termômetros de vidro devem ter escala adequada (faixa de medição e graduação) ao uso 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 mEI

#### 5.1.1 Fórmula:

Peptona	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	15,0g
Esculina	1,0g
Extrato de levedura	30,0g
Ciclohexamida	0,05g
Azida sódica	0,15g
Indoxil-β-D-Glucosídeo	0,75g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL

#### 5.1.2 Preparo

Pesar o meio desidratado ágar mEI nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio de cultura, após retirar da autoclave, em banho-maria a 44-46°C. A seguir, com todos os cuidados de assepsia, adicionar ao mesmo:

a) Solução de ácido nalidíxico;

Misturar 0,24g de ácido nalidíxico em 5mL de água purificada estéril e adicionar algumas gotas de uma solução de hidróxido de sódio 0,1N para dissolver o antibiótico. Esterilizar por filtração, utilizando um conjunto de filtração a vácuo estéril, com membrana filtrante de 0,22µm e juntar essa solução ao meio preparado;

b) Cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio (TTC);

Adicionar 0,02g de cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio ao meio preparado e misturar bem.

Alternativamente, as seguintes soluções podem ser usadas:

a) Ácido nalidíxico:

Adicionar 0,48g de ácido nalidíxico e 0,4mL de uma solução de hidróxido de sódio 10N em 10mL de água purificada estéril e misturar. Esterilizar a solução por filtração (como em 5.1.2.a) e adicionar 5,2mL por litro de meio. Armazenar a solução sob refrigeração, durante no máximo, duas semanas.

b) Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC):

Adicionar 0,1g de TTC em 10mL de água purificada e aquecer para dissolução. Esterilizar por filtração (como em 5.1.2.a) e adicionar 2mL por litro de meio. Armazenar a solução sob refrigeração, durante no máximo, duas semanas.

Distribuir volumes de aproximadamente 4mL em placas de Petri de plástico de 49 x 13mm, previamente esterilizadas e deixar solidificar. Verificar o pH do meio, cujo valor final deve ser  $7,1 \pm 0,2$ .

### 5.1.3 Armazenamento

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

## 5.2 Caldo Infusão de cérebro e coração (Caldo BHI)

### 5.2.1 Fórmula:

Cérebro de carneiro (infusão de 200g)	7,7g
Coração bovino (infusão de 250g)	9,8g
Proteose-peptona	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Monohidrogeno fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,5g
Dextrose	2,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	$7,4 \pm 0,2$

### 5.2.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 15mm x 150mm com tampa de rosca, distribuir volumes de 10mL e esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos.

### 5.2.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (menor que  $30^\circ\text{C}$ ), durante no máximo, três meses.

## 5.3 Caldo Infusão de cérebro e coração com 6,5% de NaCl (Caldo BHI com 6,5% de NaCl)

### 5.3.1 Fórmula:

Cérebro de carneiro (infusão de 200g)	7,7g
Coração bovino (infusão de 250g)	9,8g
Proteose-peptona	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	65,0g
Monohidrogeno fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,5g
Dextrose	2,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	$7,4 \pm 0,2$

### 5.3.2 Preparo

Pesar o meio desidratado caldo BHI nas quantidades determinadas pelo fabricante, adicionar o cloreto de sódio de forma que a concentração final seja 6,5% e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não

seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 15mm x 150mm com tampa de rosca, distribuir volumes de 10mL e 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 (menor que 30°C), durante, no máximo, três meses.

## 5.4 Ágar Infusão de cérebro e coração (Ágar BHI)

### 5.4.1 Fórmula:

Cérebro de carneiro (infusão de 200g)	7,7g
Coração bovino (infusão de 250g)	9,8g
Proteose-peptona	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Monohidrogeno fosfato de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5g
Dextrose	2,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,4±0,2

### 5.4.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 50-55°C em banho-maria e distribuir volumes de, aproximadamente, 12mL em placas de Petri de 90 x 15mm.

### 5.4.3 Armazenamento

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

## 5.5 Ágar bile esculina

### 5.5.1 Fórmula:

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Bile de boi	40,0g
Esculina	1,0g
Citrato férrico	0,5g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,6 ± 0,2

### 5.5.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos, estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 44-46°C em banho-maria e distribuir volumes de, aproximadamente, 15mL em placas de Petri de 90 x 15mm.

### Notas:

- O meio desidratado disponível comercialmente contém 20,0g de bile de boi;
- O aquecimento excessivo pode causar escurecimento do meio de cultura.

### 5.5.3 Armazenamento

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

### 5.6 Água de diluição

#### 5.6.1 Fórmula:

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

#### 5.6.2 Preparo

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

Dihidrogenofosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	34,0g
Água purificada	1000mL

Dissolver o dihidrogeno fosfato 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 com água purificada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração, durante no máximo, dois meses;

**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 hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	81,1g
Água purificada	1000mL

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

c) adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B a 1000mL de água purificada;

d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de  $90 \pm 2$ 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 de acordo com o volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 e 1000mL).

### 5.6.3 Armazenamento

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

### 5.7 Solução de hidróxido de sódio1N

### 5.7.1 Fórmula:

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

### 5.7.2 Preparo

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

### 5.7.3 Armazenamento

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

## 5.8 Solução de hidróxido de sódio 10N

### 5.8.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH)	400g
Água purificada	1000mL

### 5.8.2 Preparo

Pesar 400g de hidróxido de sódio e dissolver em 1000mL de água purificada.

### 5.8.3 Armazenamento

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

## 5.9 Solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%

### 5.9.1 Fórmula:

Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30% p.a	10mL
Água purificada	1000mL

### 5.9.2 Preparo

Colocar 10mL de peróxido de hidrogênio 30% p.a. em um balão volumétrico e completar com água purificada. Agitar bem até a completa homogeneização. Distribuir o volume em frasco âmbar ou protegido da luz, com tampa rosqueada, de capacidade de 100mL.

### 5.9.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser estocada sob refrigeração, durante, no máximo, três meses.

## 6 Execução do ensaio

### 6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para a quantificação de enterococos baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante estéril com porosidade de 0,45µm. As bactérias presentes nas amostras por apresentarem dimensões maiores que os poros da membrana, ficarão retidas em sua superfície. Por sua vez, a membrana será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial para enterococos (Ágar mEI). Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período determinado de incubação (24±2h a 41 ± 0,5°C), desenvolvem-se colônias com características típicas (de qualquer coloração que apresentarem um halo azul). A partir da contagem dessas colônias, calcula-se a densidade de enterococos na amostra analisada.

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

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

6.3.2 Antes de iniciar a análise, 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) e adaptados(s) ao suporte de filtração ("manifold" ou um suporte especial), 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 49 x 13mm, contendo o meio ágar mEI, 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 Busen para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;

e) provetas graduadas estéreis com a abertura recoberta com papel alumínio e 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 frascos de diluição (volume de  $90 \pm 2$ mL) e em balões ou frascos de 1000mL; e

g) membranas filtrantes de acetato de celulose ou acetato de celulose e nitrato de celulose estéreis, com 47mm de diâmetro, porosidade de  $0,45\mu\text{m}$ , brancas e 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 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 no início de cada série de filtração e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para filtração:

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 10mL:

a)homogeneizar a amostra por agitação manual, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço; e

b)distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis previamente identificadas ou então em porta-filtro com graduação, e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.5.2.Para volumes inferiores a 10mL:

a)homogeneizar a amostra (como 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 (diluição da amostra), efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:

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

b) homogeneizar a amostra (como em **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  $90 \pm 2$  mL de água de diluição estéril. Estará preparada a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), sendo que 1ml da mesma corresponde ao volume de 0,1mL da amostra;

c) 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  $90 \pm 2$  mL de água de diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,01mL de amostra; e

d) preparar as diluições seguintes da mesma forma, até a maior diluição definida em função do nível de contaminação da amostra.

6.3.5.4 Após o preparo das diluições, e homogeneização da diluição selecionada para a filtração (conforme **6.3.5.1.a**), retirar o volume de 1,0mL 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 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 e incubação da amostra

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

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

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

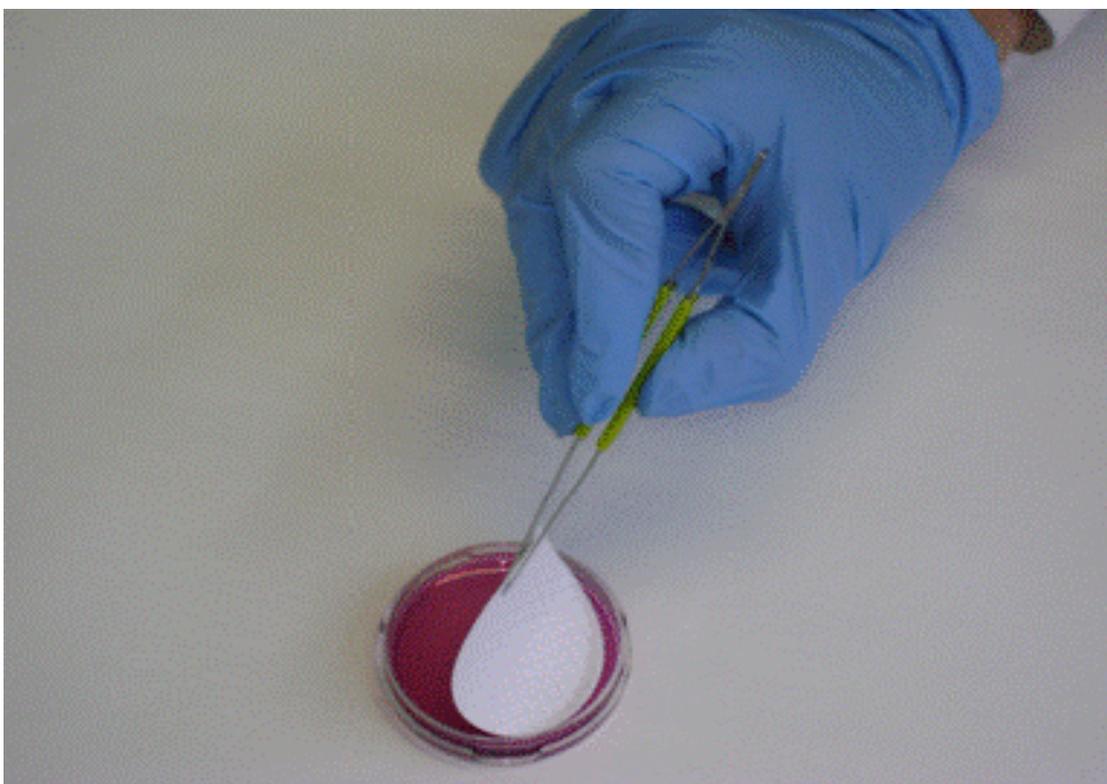
6.3.6.4 Desligar a válvula de controle de vácuo do porta-filtro ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante, desligando o vácuo imediatamente após o término do processo de filtração.

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

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

**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 de área de filtração), com as extremidades da pinça previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar 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 à bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura dificultando ou mesmo impedindo 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.

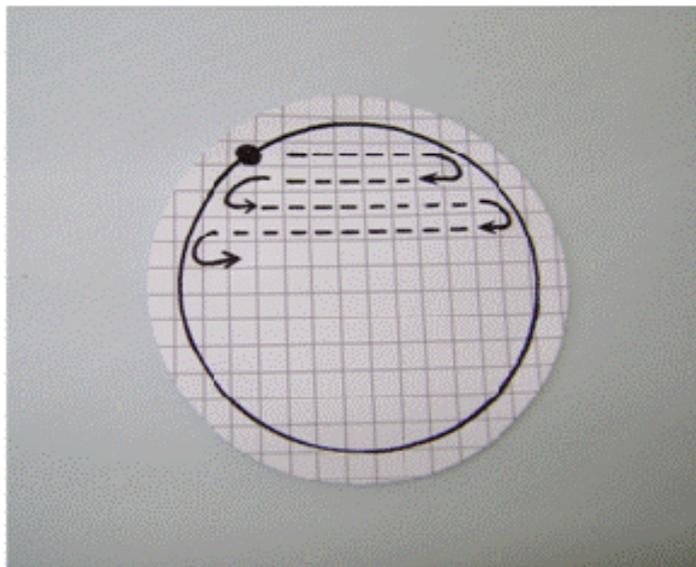
6.3.7 Após as filtrações, colocar as placas de Petri, contendo o meio de cultura e a membrana, em posição invertida em bandejas ou estantes nos quais foram colocadas folhas de papel toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água e incubar as placas a  $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas.

### 6.3.8 Leitura

6.3.8.1 Após o período de incubação e com o auxílio de um microscópio estereoscópico com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias típicas de enterococos, com halo azul, indiferentemente da cor da colônia.

6.3.8.2 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias típicas de enterococos no ágar mEI se situam entre 20 e 60 colônias. Para efetuar a contagem, observar as figuras 3 e 4.

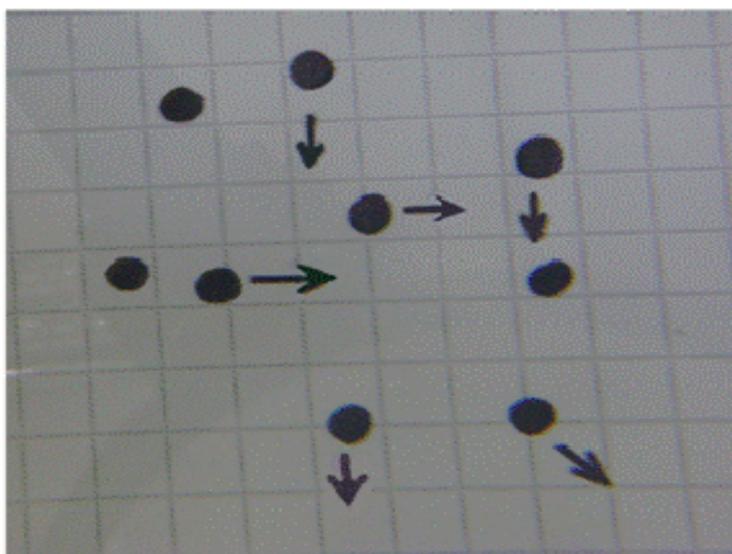
**Figura 3** – Modelo para contagem das colônias



FONTE: CETESB

**Nota:** O círculo interno indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a sequência 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

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

6.3.8.4 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.

6.3.8.5 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.

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

6.3.8.7 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens superiores a 60, mas for possível contar as colônias no menor desses volumes, efetuar a contagem e o cálculo e expressar o resultado como densidade estimada.

6.3.8.8 Quando os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, calcular e expressar os resultados, respectivamente, segundo os itens **7.1.3**, e **7.2.2** ou **7.2.3**.

6.3.8.9 Quando a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente) a contagem de colônias não é efetuada.

**Nota:** 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 7.1.4 e 7.2.4**

## 7 Resultado

### 7.1 Cálculos

7.1.1 Selecionar a placa com o número de colônias típicas, com halo azul (indiferentemente da cor da colônia), dentro dos limites aceitáveis (20 a 60). Calcular a densidade de enterococos por 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Enterococos/100mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias típicas}}{\text{Volume filtrado da amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado, conforme o **item 6.3.8.4 e 6.3.8.6**, calcular a densidade em 100mL através da seguinte fórmula:

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

7.1.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizarem 100mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e utilizar a fórmula geral apresentada no **item 7.1.1** para o cálculo da densidade de enterococos em 100mL e o **item 7.2.2** para a 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 os seguintes casos:

7.1.4.1 – Quando a amostra for de água de consumo humano ou de água mineral ou natural envasada, expressar o resultado como **item 7.2.4.1**

7.1.4.2 Quando a amostra for de água bruta ou efluente, considerar o valor de 60 colônias no menor volume filtrado, utilizar a fórmula geral apresentada no **item 7.1.1** para cálculo dos resultados e o **item 7.2.4.2** para expressão dos resultados.

## 7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de enterococos determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como:

### **Unidades formadoras de colônias de enterococos por 100mL ou UFC de enterococos/100mL**

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

### **Unidades formadoras de colônias de enterococos / 100mL: < valor obtido**

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

### **Unidades formadoras de colônias de enterococos / 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, considerar os seguintes casos para expressão dos resultados:

7.2.4.1 – Para águas de consumo humano ou águas minerais ou naturais envasadas:

### **Presença de enterococos - contagem prejudicada devido a crescimento confluyente**

7.2.4.2 – Para águas brutas ou efluentes, calcular o resultado conforme o **item 7.1.4.2**:

### **Unidades formadoras de colônias de enterococos > valor obtido/100mL**

## **8 Procedimento de verificação para controle de qualidade**

A verificação das colônias típicas com halo azul, para confirmação dos enterococos 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.

**Nota:** Se o número total de colônias típicas for menor que 10, confirmar todas as colônias.

8.2 Identificar placas de ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI) de tal modo que cada colônia corresponda uma placa de meio.

8.3 Com auxílio de uma agulha de inoculação, devidamente flambada e resfriada, estriar e espalhar para isolamento um inóculo de cada colônia típica em placas de ágar BHI e incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por um período de  $24 \pm 2$  a  $48 \pm 4$ h.

8.4 Após o período de incubação, transferir, com auxílio de uma agulha de inoculação, devidamente flambada e resfriada, partes de uma colônia bem isolada de cada placa de ágar BHI para um tubo de caldo BHI e duas lâminas de vidro.

8.5 Incubar o caldo BHI a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$ h.

8.6 Em uma das lâminas de vidro, na qual foi colocada a cultura, adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3 %. A formação de bolhas constitui teste de catalase positivo, indicando que a colônia não pertence ao gênero *Enterococcus*. Se o teste de catalase for negativo (isto é, não produz bolhas), realizar uma coloração de Gram na segunda lâmina de vidro, para posterior microscopia. Os enterococos se apresentam como cocos Gram-positivos, se o resultado for diferente, não prosseguir com os outros testes.

8.7 A partir do crescimento em caldo BHI transferir um inóculo para os seguintes meios:

8.7.1 ágar bile esculina: incubar a  $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 4$ h;

8.7.2 ágar BHI: incubar a  $10^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 4$ h;

8.7.3 caldo BHI: incubar a  $45^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 4$ h;

8.7.4 caldo BHI com 6,5% NaCl: incubar a  $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 4$ h;

8.8 As colônias que apresentarem catalase negativa, cocos Gram-positivos, hidrólise da esculina em ágar bile esculina (isto é, produzem precipitado preto ou marrom), crescimento em caldo BHI a  $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , em ágar BHI a  $10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e caldo BHI com 6,5% NaCl a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  são confirmadas como enterococos.

## 9 Referências

APHA; AWWA; WEF. 9230. Fecal enterococcus/streptococcus groups. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22th edition. Washington, DC, 2012.

BLANCH, A.R. et al. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 994-1002, jun. 2003.

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.

FISHER, K. ; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, jun. 2009.

FUJIOKA, R. et al. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and Enterococci in Guam' streams. **Journal of Applied Microbiology: Symposium Supplement** 1999, v. 85 (S1), p. 83S-89S, dec. 1998.

KÜHN, I. et. al. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 133-145, dec. 2003.

MÜLLER, T. et al. Identification of plant-associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 268-278, aug. 2001.

PRÜSS, A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. **International Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 1-9, feb. 1998.

USEPA. **Method 1600**: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-Enterococcus indoxyl- $\beta$ -D-glucoside agar (mEI), Washington, DC, 2002. (EPA 821-R-02-022), Disponível em: <<http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-1600.pdf>>. Acesso em: jun. 2012.

USEPA **Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria**. Washington, DC, 2004. (EPA 823-B-04-002). Disponível em: <[http://www.waterquality.utah.gov/WQS/20071017\\_Implementation\\_Guidance-Bacteria.pdf](http://www.waterquality.utah.gov/WQS/20071017_Implementation_Guidance-Bacteria.pdf)>. Acesso em: jun. 2012.

USEPA. **Review of published studies to characterize relative risks from different sources of fecal contamination in recreational water**. Washington, DC, 2009. (EPA 822-R-09-001) Disponível em: <[http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/2009\\_07\\_16\\_criteria\\_recreation\\_fecalcontamrecreationalwaters.pdf](http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/2009_07_16_criteria_recreation_fecalcontamrecreationalwaters.pdf)>.

WADE, T. J. et al. Do U.S. Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational Waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n.8,p. 1102-1109, jun. 2003.

WADE, T. et al. Rapidly measurement indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1,p. 24-28, jan. 2006.

WADE, T. et. al. Rapidly measurement indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. **Environmental Health**, v. 9, n. 66,p. 1-14, oct. 2010.

WHO . **Guidelines for safe recreational water environments**: coastal and fresh waters, Geneva, Switzerland, 2003. v. 1 Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241545801\\_contents.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241545801_contents.pdf)>. Acesso em: jun. 2012.

WHO . **Guidelines for drinking-water quality**. 4<sup>th</sup> ed Geneva, Switzerland, 2011. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf)>. Acesso em: jun. 2012.

WIEDENMANN, A. et al. A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2. p. 228-236, feb. 2006.

---