CETESB

NORMA TÉCNICA

L5.219

Dez/1989
22 PÁGINAS

Actinomicetos - contagem em placas: 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: // w w w . c e t e s b . s p . g o v . b r

CETESB	**ACTINOMICETOS - CONTAGEM EM PLACAS** Método de ensaio	L5.219 DEZ/89

SUMÁRIO Pág.

Introdução..... 1
1 Objetivo..... 2
2 Normas complementares..... 2
3 Definições..... 3
4 Aparelhagem..... 5
5 Execução do ensaio..... 7
6 Resultados..... 15
Anexo A - Meios de cultura alternativos para determinação da densidade de actinomicetos em água, esgoto e solo... 17
Anexo B - Recomendações de ordem geral..... 19
Anexo C - Referências bibliográficas..... 21

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos durante muito tempo foram considerados como fungos imperfeitos por sua complexidade morfológica. No entanto, certas características biológicas fundamentais apresentadas pelos actinomicetos levaram à sua classificação como bactérias. Amplamente distribuídos na natureza e constituindo uma considerável parcela da população do solo e da água, os actinomicetos possuem um papel ecológico extremamente importante na degradação das proteínas, celulose e outras substâncias (incluindo ceras, goma e parafina), contribuindo como a maior parte das bactérias e fungos para a manutenção da fertilidade do solo e a estabilidade geoquímica da biosfera. Os gêneros mais freqüentes presentes no solo e na água são: Streptomyces, Micromonospora e Nocardia, sendo os dois primeiros os mais representativos.

Em relação ao papel dos actinomicetos no ambiente aquático, sua importância econômica é reconhecida há longo tempo e se relaciona basicamente com sua capacidade de produzir materiais orgânicos solúveis em água e substâncias odoríferas, que podem ser transportadas para o sistema de distribuição, afetando assim a qualidade da água. Pesquisas recentes têm demonstrado que os compostos geosmin, e metilisoborneol são os agentes responsáveis pelo gosto e odor de terra molhada na água. Estes compostos, que atuam também como contaminantes de peixes, têm sido extraídos de culturas de numerosos actinomicetos.

Assim, traços destes compostos na água são suficientes para propagação de um odor desagradável ou sabor lamacento nos peixes. Os actinomicetos também estão relacionados com problemas nos processos de tratamento de esgoto e lodo ativado, sendo que um crescimento maciço é capaz de produzir espuma espessa, prejudicando o tratamento.

Embora o enfoque especial nos estudos sobre a importância ecológica dos actinomicetos em água seja relativo à sua ação na deterioração da qualidade da água, pesquisas evidenciam sua importante participação no processo de auto-purificação das águas de rios e lagos, graças à sua capacidade de converter material orgânico sólido em substâncias líquidas metabolizáveis por bactérias.

Certos actinomicetos produzem no homem, animais e plantas doenças denominadas genericamente de actinomicoses, que podem apresentar-se sob formas benignas ou muito graves. Os actinomicetos aeróbios patogênicos pertencem aos gêneros Nocardia, Streptomyces e Dermatophilus e os anaeróbios, ao gênero Actinomyces.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação da densidade de actinomicetos em água, esgoto e solo através da técnica de "pour-plate" (usando camada dupla de ágar), como instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

a) avaliação das condições de proteção de poços, fontes, reservatórios e sistemas de distribuição de água para consumo humano;

b) avaliação da eficiência das diversas etapas de operação de estações de tratamento de água na remoção destas bactérias;

c) estimativa da biomassa de actinomicetos presentes em corpos de água, esgoto, solo e lodo;

d) prevenção e determinação das possíveis causas de deterioração da qualidade da água.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;

b) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;

c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;

d) Guia de Orientação para Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/SEMA).

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições 3.1 a 3.15.

3.1 Actinomicetos

Bactérias filamentosas ramificadas, septadas ou não, Gram-positivas, a maioria capaz de produzir esporos isolados, agrupados ou mesmo reunidos em um esporângio. Quase todos os actinomicetos são aeróbios, com algumas exceções que são anaeróbios estritos.

3.2 Streptomyces

Bactérias aeróbias, Gram-positivas, apresentando filamentos muito ramificados que não se fragmentam com facilidade e um típico micélio aéreo, que, na maturidade, forma cadeias de três ou mais esporos. Produzem um pigmento melanínico e têm capacidade de assimilar arabinose, xilose, manose, rafinose e manitol. São catalase positivas, geralmente reduzem nitratos a nitritos e degradam adenina, esculina, caseína, gelatina, hipoxantina, amido e L-tirosina. Os estreptomicetos se desenvolvem em meio sólido, formando colônias duras, de aparência calcária, e aderem fortemente ao substrato. Apresentam-se incolores ou com coloração variada (branca, amarela, verde, cinza, etc.). As formas no solo são saprófitas e poucas são parasitas de plantas e animais.

3.3 Nocardia

Bactérias quimiorganotróficas de metabolismo oxidativo, Gram-positivas, imóveis, catalase positivas e aeróbias. Apresentam hifas vegetativas, que variam da forma rudimentar até extensivamente ramificada, as quais usualmente se fragmentam em elementos bacilares e cocóides. As hifas aéreas, muitas vezes visíveis só microscopicamente, são sempre formadas. Em meio sólido, desenvolvem-se formando colônias de consistência pastosa ou seca, que podem ser facilmente levantadas com fio de platina. Apresentam-se com coloração rosa a vermelha, cobertas com o micélio aéreo branco.

3.4 Micromonospora

Bactérias filamentosas ramificadas septadas, Gram-positivas e não ácido-resistentes. O micélio aéreo pode estar ausente ou, em algumas culturas, aparecer irregularmente, apresentando uma coloração branca

ou cinza. Seus esporos apresentam-se individuais, sésseis ou em curtos ou longos esporóforos. São bactérias geralmente aeróbias ou microaerófilas, freqüentemente saprófitas. As colônias no ágar têm um crescimento periférico limitado, crescendo na superfície do meio, dando uma aparência de "miolo de amêndoa".

3.5 Esporóforo

Porção do corpo vegetativo, que, direta ou indiretamente, se destina à reprodução do organismo.

3.6 Esporo

Célula haplóide, formada em órgãos especiais e capaz de gerar novo organismo.

3.7 Esporângio

Órgão de reprodução assexuada. E'uma estrutura pequena e saculiforme, dentro da qual são produzidas as células reprodutivas ou esporos.

3.8 Micélio

Conjunto de filamentos ramificados ou em rede (hifas). Vegetativos ou de reprodução, sendo os últimos responsáveis pela produção de esporos. As hifas dos micélios de reprodução são, em geral, aéreas, enquanto algumas hifas do micélio vegetativo podem penetrar no meio, em busca de nutrientes.

3.9 Parasita

Organismo que se nutre à custa de um hospedeiro de espécie diferente, sobre ou em cujos tecidos vive fixado, enfraquecendo-o.

3.10 Saprófita

Bactéria que não exerce nenhuma ação nociva sobre os seres vivos. Vivem à custa de matéria morta e são agentes destruidores de células vegetais e animais mortas.

3.11 Pigmento melanínico

Coloração marrom, marrom escura ou preta, produzida pelos organismos, quando crescem no meio de cultura.

3.12 Técnica de "pour plate" usando camada dupla de ágar

Técnica que consiste no inóculo da amostra em meio de cultura fundido e estabilizado à temperatura de (45 $\pm$ 1)°C e posterior adição na placa contendo meio de cultura já sólido.

3.13 Densidade bacteriana

Número de unidades formadoras de colônias de bactérias por unidade de volume (UFC/mL).

3.14 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

3.15 p.a.

Para análise.

3.16 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 103 393 Pa (15 psi ou 1,054 kgf/cm^2), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6^{o}C ao nível do mar. Deve ser operada de maneira que todo o ar existente na câmara seja substituído por vapor. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.2 Balança

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

4.1.3 Banho-maria

Equipado com termostato para manutenção da temperatura na faixa de 44-46°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo o meio de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

4.1.4 Bico de Bunsen

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 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda vidraria e aparelhagem que possam ser esterilizadas por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170°C a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, a uma temperatura de 170°C a 180°C.

4.1.7 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura, em todas as partes utilizadas, seja a requerida para os testes: 25°C a 28°C. Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação de ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, deve ser colocado um ou mais termômetros,com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75% a 85% de umidade relativa a ser colocada em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16°C a 27°C.

4.1.8 Microscópio binocúlar

Com oculares de 10x e objetivas de 50x e 100x.

4.1.9 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 por dia, com tampões de pH = 4,0, pH = 6,86 e pH = 9,18.

4.1.10 Refrigerador

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

4.2 Materiais

4.2.1 Balões de fundo chato

Com capacidades de 1L e 2L.

4.2.2 Béquer

Com capacidade de 1L.

4.2.3 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com graduação para (90 ± 2) mL de água de diluição, e volume total suficiente para permitir uma boa homogeneização, quando se efetuar a agitação.

4.2.4 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.

4.2.5 Frascos de Erlenmeyer

Com capacidade de 100 mL e 1 L.

4.2.6 Materiais para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro neutro ou aço inoxidável. Devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica.

4.2.7 Pipetas

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

4.2.8 Placas de Petri

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

4.2.9 Tela de amianto

Com dimensões de 22 cm x 22 cm.

4.2.10 Tripé

4.2.11 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter 17 mL do meio de cultura. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

A determinação da densidade de actinomicetos em uma amostra baseia-se

no princípio de que, definindo condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, se houver actinomicetos, viáveis na água, esgoto ou solo, que possam se desenvolver nas condições estabelecidas, haverá formação de colônias típicas que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para isso, volumes adequados da amostra são inoculados no meio de cultura fundido, ágar-amido-caseína com actidiona (camada superior), e vertidos em placas com ágar-amido-caseína já solidificado (camada de fundo). Após o período determinado de incubação, é feita a contagem das unidades formadoras de colônias de actinomicetos que apresentem bordas irregulares e superfície pulverulenta com aspecto radiado e aderidas fortemente ao substrato.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções são necessários os seguintes reagentes:

a) ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (EDTA);

b) actidiona (cicloheximida);

c) ágar;

d) amido solúvel p.a.;

e) carbonato de cálcio ($CaCO_3$) p.a.;

f) caseína;

g) cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$) p.a.;

h) cloreto de sódio (NaCl) p.a.;

i) fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.;

j) fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a.;

l) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;

m) nitrato de potássio (KNO_3) p.a.;

n) sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$) p.a.;

o) sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) p.a.;

p) tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) p.a.

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

5.3 Meios de cultura

5.3.1 Ágar-amido-caseína

Fórmula:

Amido solúvel.....	10,0 g
Caseína.....	0,3 g
Nitrato de potássio (KNO_3) p.a.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	2,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.....	2,0 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) p.a.....	0,05 g
Carbonato de cálcio ($CaCO_3$) p.a.....	0,02 g
Sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$) p.a.....	0,01 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final após esterilização: 7,0 ± 0,2

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH com solução de hidróxido de sódio (NaOH-1N).

Distribuição do meio de cultura:

a) em tubos - distribuir volumes de 17 mL em tubos de 18 mm x 180 mm, tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos;

b) em placas - esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos e, a seguir, distribuir volumes de 15 mL em placas de Petri. Após a solidificação do ágar, o meio de cultura pode ser armazenado em geladeira durante até 4 semanas, após o acondicionamento adequado das placas de Petri.

5.4 Soluções

5.4.1 Solução de actidiona a 0,1% (cicloheximida)

Fórmula:

Actidiona.....	0,1 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparo:

Pesar 0,1 g de actidiona colocar em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até completa dissolução. Armazenar sob refrigeração (2-8°C), durante um período má

ximo de 6 meses.

Nota: Devido ao seu alto potencial tóxico, a solução de actidiona deve ser manuseada com muito cuidado e sua pipetagem deve ser realizada com auxílio de uma pera de sucção ou pipetador de segurança (ver Anexo B).

5.4.2 Água de diluição

Fórmula:

Solução-estoque A..... 1,25 mL
Solução-estoque B..... 5,00 mL
Água destilada..... 1 000 mL
pH final após esterilização: 7,2 ± 0,1

Preparo: A água de diluição deve ser preparada como segue:

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

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a... 34,0 g
Água destilada q.s.p..... 1 000 mL
Dissolver o fosfato de potássio monobásico com 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,1 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes que sejam 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;

b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$) p.a..... 81,1 g
Água destilada q.s.p..... 1 000 mL
Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso no laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira;

c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B e completar o volume para um litro com água destilada;

d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a 121°C durante 15 minutos, volumes de (90 ± 2) mL.

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

5.4.3 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)

Fórmula:

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

Preparo:

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

5.4.4 Solução de tiossulfato de sódio a 1,8%

Fórmula:

Tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$).....	18,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiossulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico de 1 000 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até completa dissolução do tiossulfato de sódio. Armazenar em frasco bem vedado.

5.4.5 Solução de EDTA a 15%

Fórmula:

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

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Homogeneizar até completa dissolução do EDTA. Armazenar em frasco bem vedado.

5.5 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Orientação para Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/SEMA), observando-se o disposto em 5.5.1.

5.5.1 Amostra

5.5.1.1 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

5.5.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas deve-se adicionar ao frasco da coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiossulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

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

5.5.1.4 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 para águas brutas e 30 horas para águas tratadas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4°C a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

5.6 Procedimento a partir de amostras líquidas (água e esgoto)

5.6.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório ou a capela de fluxo laminar, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.6.2 Preparar placas de Petri contendo meio de cultura ágar-amido-caseína (camada de fundo) em triplicata para cada volume da amostra a ser inoculado e proceder à identificaçãpo das mesmas, anotando, na tampa de cada placa, o número designado pelo laboratório para a amostra, o volume a ser inoculado, a data e o tipo de água.

5.6.3 Homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço. Para essa finalidade pode ser utilizado também um homogeneizador mecânico.

5.6.4 Com todos os cuidados de assepsia, transferir 2 mL da amostra e 1 mL da solução de actidiona a 0,1% para um tubo de ensaio contendo 17 mL do meio ágar-amido-caseína, previamente fundido e estabilizado à temperatura de 44-46°C, em banho-maria.

5.6.5 Com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, homogeneizar o meio de cultura, o antibiótico e o inóculo da amostra contidos no tubo de ensaio.

5.6.6 Utilizando a mesma pipeta, transferir imediatamente 5 mL do conteúdo do tubo de ensaio para cada uma das placas de Petri correspondentes, já contendo a camada de fundo (ver 5.6.2). Para essa transferência descrever com a pipeta movimentos circulares suaves na superfície da camada de fundo, visando obter uma distribuição uniforme do inóculo.

Nota: A camada superficial resultante da solidificação do meio de cultura contendo 0,5 mL da amostra ou da diluição utilizada deve ser delgada para que as colônias se desenvolvam na superfície, facilitando, assim, sua visualização e contagem.

5.6.7 Quando for necessário examinar volumes ou quantidades decimais inferiores a 1 mL da amostra, realizar as diluições da seguinte maneira:

a) homogeneizar a amostra (como em 5.6.3) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo (90 ± 2) mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 mL da

amostra;

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

c) proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3}, 10^{-4},...10^{-8},...).

Nota: A escolha das diluições depende do tipo e característica da amostra. Assim, para amostras de água bruta as diluições até 1:1000 (10^{-3}) são freqüentemente adequadas, enquanto que, para amostras de solo, devem ser utilizadas diluições de 1:1000 (10^{-3}) até 1:1000 000 (10^{-6}). Amostras de água tratada podem ser examinadas diretamente.

5.6.8 Homogeneizar a diluição desejada (como em 5.6.3) e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 2 mL da diluição e 1 mL da solução de actidiona a 0,1% para um tubo contendo 17 mL do meio ágar-amido-caseína, previamente fundido e estabilizado a uma temperatura de 44-46°C em banho-maria.

5.6.9 Proceder da mesma forma que em 5.6.5 e 5.6.6.

5.6.10 Após a solidificação da camada superior, incubar as placas a uma temperatura de 25°C a 28°C durante 6 a 7 dias, em posição invertida, para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio de cultura.

5.6.11 Após o período de incubação, selecionar para leitura as placas em triplicata correspondentes ao volume inoculado que tenha fornecido contagens entre 30 e 300 colônias e efetuar a contagem nessas três placas (Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens inferiores a 30, efetuar a contagem nas placas correspondentes ao maior volume). Calcular o média aritmética das contagens, multiplicar por dois e o resultado multiplicar pelo inverso da diluição utilizada dessas placas.

Nota: Quando necessário, em caso de dúvida na identificação da colônia, efetuar exame microscópico com aumento de 50x a 100x. A distinção dos principais gêneros é feita com base na esporulação, arranjo de esporos, dispersão de filamentos, diâmetros

das hifas, assim como outras características morfológicas, culturais e bioquímicas.

5.7 Procedimento a partir de amostras sólidas ou semi-sólidas (solo e resíduos sólidos)

5.7.1 Proceder da mesma forma que em 5.6.1 e 5.6.2.

5.7.2 Homogeneizar a amostra e transferir uma quantidade significativa para um béquer com capacidade de 1 000 mL.

5.7.3 Macerar a amostra previamente selecionada e, se necessário, retirar, com auxílio de uma pinça, pedaços de madeira, papel, raízes, etc. Após este processo, homogeneizar novamente a amostra,

5.7.4 Pesar 50 g da amostra já macerada e homogeneizada e transferir para um balão contendo 450 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 g da amostra.

5.7.5 Homogeneizar a amostra contida no balão em agitador de aproximadamente 120-150 oscilações por minuto, durante cerca de 30 minutos.

5.7.6 Após a homogeneização da amostra, proceder conforme 5.6.7 a 5.6.11.

Nota: Quando as amostras são de solo ou resíduos sólidos (amostras sólidas ou semi-sólidas), recomenda-se usar a correção para a quantidade de água presente na amostra, expressando o resultado em gramas de peso seco.

6 RESULTADOS

6.1 Expressar o resultado em termos de unidades formadoras de colônias de actinomicetos por mililitro (UFC/mL), por grama (UFC/g) ou por grama de peso seco (UFC/g de peso seco).

6.1.1 Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados não apresentarem colônias, expressar o resultado como < 1 multiplicado pelo inverso do maior volume inoculado (Exemplo: para uma amostra, cujo maior volume inoculado foi de 0,01 mL e não se observou crescimento em nenhuma das placas, o resultado é expresso como < 100 UFC/mL).

6.1.2 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, relatar o resultado como > 300, multiplicado pelo inverso do menor volume inoculado.

6.1.3 Os resultados das médias das contagens superiores a 99 devem ser arredondados, segundo as seguintes regras:

a) quando o algarismo das unidades for igual ou maior que 5(cinco), abandona-se o mesmo e soma-se uma unidade ao algarismo das dezenas (exemplo: 165 é expresso como 170);

b) quando o algarismo das unidades for menor que 5 (cinco), abandona-se simplesmente o mesmo (exemplo: 142 é expresso como 140).

6.1.4 Quando as placas não puderem ser contadas devido a erro nas diluições,quebra acidental das amostras ou quando se observarem evidências de contaminação, relatar o resultado como: "análise prejudicada devido a acidente de laboratório".

6.2 Do relatório deve constar, no mínimo:

a) local e data de coleta e análise;

b) caracterização completa da amostra;

c) nome do coletor da amostra;

d) resultado do ensaio, expresso conforme 6.1;

e) código desta Norma e técnica utilizada;

f) nome e assinatura do responsável pela análise.

/ANEXO A

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA ISOLAMENTO E CONTAGEM DE ACTINOMICETOS EM ÁGUA ESGOTO E SOLO

Alguns autores utilizam meios alternativos ao recomendado pelos "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (ágar-amido-caseína) para o isolamento e contagem de actinomicetos em água e solo. São apresentadas, a seguir, as especificações relativas à composição e preparo desses meios de cultura.

A-1 Ágar para o isolamento de actinomicetos (meio desidratado-Manual Difco)

Preparado de acordo com a fórmula de Olson (1960) e recomendado para o isolamento de actinomicetos em água e solo.

Fórmula:

Caseína de sódio	2,0 g
Asparagina	0,1 g
Propionato de sódio	4,0 g
Fosfato de potássio dibásico	0,5 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Sulfato ferroso	0,001 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1 000 mL

pH final após esterilização: 8,1 ± 0,2 a 25°C

Preparo:

Pesar 22 g do meio desidratado "Bacto Actinomycete Isolation Agar", acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Adicionar 5 g de glicerol, homogeneizar e esterilizar em autoclave a 121ºC durante 15 minutos.

A-2 Ágar Actinomiceto

Preparado de acordo com a fórmula citada por Pochon (1962) recomendado para o isolamento e contagem de actinomicetos em solo.

Fórmula:

Glicerol	10,0 g
Asparagina de sódio	1,0 g
Fosfato de potássio dibásico	1,0 g

Solução de traços de elementos.....	1 mL
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final após esterilização: 7,0 ± 0,1

Preparo:

Pesar todos os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solução de traços de elementos

Fórmula:

Molibdato de potássio (ou amônio).....	0,05 g
Borato de sódio.....	0,05 g
Percloreto de ferro (sulfato férrico vermelho).....	1 gota
Nitrato de cobalto.....	0,05 g
Sulfato de cádmio.....	0,05 g
Sulfato de cobre.....	0,05 g
Sulfato de zinco.....	0,05 g
Sulfato de manganês.....	0,05 g
Água destilada.....	1 000 mL

Fazer passar uma corrente de CO_2 na solução.

Preparo:

Pesar os reagentes, exceto o percloreto de ferro, e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar agitando até completa dissolução do meio e acrescentar 1 gota de percloreto de ferro. Homogeneizar. Passar uma coreente de CO_2 na solução. Estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca fora do alcance da luz, em geladeira.

/ANEXO B

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

B-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 meio de cultura, colocando-as no centro da caixa contendo os meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24 a 48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, 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 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meio de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens, em local fresco e seco, protegidos da luz. Em laboratórios não equipados com ar condicionado, o armazenamento dos meios desidratados deve ser efetuado colocando-se os frascos de boca para baixo; isto produz um efeito de selagem conveniente ao redor da tampa de rosca, que retardará a decomposição do meio.

B-5 Cuidados no preparo dos meios de cultura

B-5.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quanto à cor, odor e, principalmente, consistência, não devendo apresentar-se endurecidos ou hidratados. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes, para que não liberem substâncias, tais como cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

B-5.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água destilada fria. principalmente para os meios que contêm ágar, pois se for utilizada água quente, forma-se imediatamente, em torno de cada partícula de ágar, uma película que protege o núcleo. Com a elevação da

temperatura, ocorre um aquecimento seco do núcleo, que impede que a partícula se umedeça totalmente. Por esse motivo, aconselha-se deixar de molho, em água destilada fria durante 15 minutos, os meios que contêm ágar, agitando-se a mistura freqüentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

B-6 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle da qualidade dos meios de cultura a serem empregados no teste para determinação da densidade de actinomicetos (ver Norma CETESB L5.216).

B-7 Precauções com o meio de cultura

B-7.1 Ao fundir o meio de cultura a ser usado na técnica de "pour plate" (camada dupla de ágar), ágar-amido-caseína, evitar:

a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o meio de cultura, pois essa, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;

b) exposição prolongada a temperaturas elevadas durante e após a fusão.

B-7.2 Durante a estabilização da temperatura dos meios de cultura a serem usados na técnica de "pour plate", evitar que a temperatura do banho-maria exceda 48°C, pois algumas bactérias mais sensíveis poderão ser mortas, quando se adiciona o inóculo da amostra ao meio de cultura.

B-8 Cuidados com o actidiona

Ocorrendo contato com a pele, lavar imediatamente com água corrente e sabão. Se ingerido, induzir a vômito por ingestão de um copo de água morna com uma colher-de-chá de sal e chamar imediatamente um médico, uma vez que, quando ingerido, pode provocar convulsões ou coma. Actidiona é um antibiótico usado apenas em laboratório para impedir o crescimento de fungos no meio de cultura.

/ANEXO C

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985, p. 992-995.

C-2 BORDNER, R. & WINTER, J. ed. Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1978, p. 186-191. (EPA-600/8-78-017).

C-3 CETESB . Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988, 150 p.

C-4 _____ . Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo 1979 (Norma Técnica L5.216).

C-5 _____ . Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).

C-6 _____ . Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1986 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão).

C-7 DIFCO LABORATORIES. Difco Manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 ed. Detroit, 1984, 1155 p.

C-8 EAK-HOUR, C. & LECLERC, H. Dénombrement des actnomycètes aérobies de l'eau. Annales Microbiologie (Institut Pasteur); 124 (B); 553-546, 1973.

C-9 _____ . Identificacion d'actinomycetes aérobies isolés d'eau douce. Journal Canadien de Microbiologie, 21(12):1985-1900, 1975.

C-10 KÜSTER, E. & WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of Streptomyces. Nature, 202:928, 1964.

C-11 LECHEVALIER,H.A. & LECHEVALIER, M.P. Biology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology, 21:71-100, 1967.

C-12 McMILLAN, L.M.; KARSHEN, S.P.; WILLEY, B.F. Identification and location of actinomycetes in the southern end of Lake Michigan. Journal American Water Works Association, 64(5):312-315, 1972.

C-13 PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1980, v 1, p. 286-289.

C-14 POCHON, J. & TARDIEUX, P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de La Tourelle. Saint-Mandé, 1962, 108 p.

C-15 ROMANO, A.H. & SAFFERMAN, R.S. Studies on actinomycetes and their odors. Journal American Water Works Association, 55:169-176, 1963.

C-16 SAFFERMAN, R.S. & MORRIS, M.E. A method for the isolation and enumeration of actinomycetes related to water supplies. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center Tech. Rep. W62-10, U.S. Public Health Serv., Cincinnati. Ohio.

C-17 SILVEY J.K.G. & CHRISTENSON, C.W. The role of aquatic actinomycetes in self-purification of freshwater streams. Journal Water Pollution Control Federation, 34(3):222-223, 1962.

C-18 SYKES, G. & SKINNER, F.A. (ed). Actinomycetales: Characteristics and practical importance . New York, Academic Press London,1973 (The Society for Applied Bacterioloy Symposium Series No. 2).

C-19 WAKSMAN, S.A. Studies in metabolism of actinomycetes.The Journal of Bacteriology, 4(3):189-215, 1918.

C-20 WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkings, 1989, V.5.