

1 OBJETIVO

Definir o método de determinação de bactérias heterotróficas formadoras de colônias existentes em amostras de águas, pela técnica de "Pour Plate" realizadas nas atividades do Setor de Análises Microbiológicas do Serviço de análises Biológicas-SERVAB.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO E VIGÊNCIA

Este método é aplicável na determinação de bactérias heterotróficas em amostras de água. A vigência deste documento se dará a partir da data de aprovação.

3 TERMOS E DEFINIÇÕES

TERMO / SIGLA	OBJETO
Água de diluição	Solução contendo sais minerais utilizada para diluição de amostras
GERLAB	Gerência de Análises Laboratoriais
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
Inóculo	Alíquota de amostra, ou substância, contendo ou não microrganismos empregados na inoculação.
ME	Método de Ensaio
PCA	Plate Count Agar
POP	Procedimento Operacional Padrão
SERVAB	Serviço de Análises Biológicas
SERVQUAL	Serviço de Qualidade
SEAMIC	Setor de Análises Microbiológicas
TL	Técnico de Laboratório (nível médio)
U.F.C.	Unidade Formadora de Colônia

4 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Maryland: Port City Press, 24nd Edition. 2023; Method 9215B;

ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

POP-INEA-GERLAB-204 – Garantia da Qualidade dos Resultados

POP-INEA-GERLAB-205 – Validação de métodos de ensaios

POP-INEA-GERLAB-206 – Elaboração de Carta de Controle

POP-INEA-GERLAB-209 – Estimativa da Incerteza de Medição

POP-INEA-GERLAB-212 – Acondicionamento e Preservação de Amostra

POP-INEA-GERLAB-317 – Registro de Resultados (Laboratório)

POP-INEA-GERLAB-325 – Registro de Carta de Controle no Labwin

POP-INEA-GERLAB-510 - Garantia da Qualidade dos Ensaios Microbiológicos

POP-INEA-GERLAB-513 – Operação do Banho Maria;

POP-INEA-GERLAB-516 – Operação do Contador de Colônias;

POP-INEA-GERLAB-519 – Operação Incubadora Bacteriológica;

POP-INEA-GERLAB-521 - Operação Cabine de Segurança Biológica;

POP-INEA-GERLAB-528 - Operação Pipetador Automático;

POP-INEA-GERLAB-1101 - Medidas gerais de segurança e prevenção de acidentes.

IT-INEA-GERLAB-006 - Instrução para a Seleção de Duplicatas nos Pontos de Amostras Ambientais

IT-INEA-GERLAB-007 - Instrução para o Recebimento e Identificação de Amostras

5 RESPONSABILIDADE GERAIS

FUNÇÃO	RESPONSABILIDADE
SERVAB	<ul style="list-style-type: none">A análise crítica deste documento é de responsabilidade do SERVAB.A execução dos procedimentos descritos é de responsabilidade de todos, salvo quando for especificada a atuação de determinado setor ou núcleo.

6 PROCEDIMENTOS

6.1 Aspectos de segurança

Para a segurança do profissional envolvido deve-se seguir o procedimento descrito no POP-INEA-GERLAB-1101- Medidas gerais de segurança e prevenção de acidentes.

6.2 Equipamentos e materiais

- ✓ Pipetador automático ou pera;
- ✓ Frasco leite graduado ou tubo de ensaio;
- ✓ Cabine de segurança biológica;
- ✓ Contador de colônias;
- ✓ Placa de Petri estéril;
- ✓ Banho-maria;
- ✓ Pipeta ou micropipeta;
- ✓ Incubadora bacteriológica;

6.3 Reagentes, soluções e padrões

- ✓ Água de diluição;
- ✓ Meio de cultura Plate Count Agar
- ✓ Cultura de trabalho da cepa padrão *Enterobacter aerogenes*, ou
- ✓ Cultura de trabalho da cepa padrão *Escherichia coli*, ou
- ✓ Cultura de trabalho da cepa padrão *Enterococcus faecalis*

6.4 Interferências

A amostra sempre deve ser manuseada segundo as técnicas de assepsia, visando à autenticidade da amostra e a confiabilidade do ensaio.

As condições de acondicionamento e preservação das amostras estão descritas no POP-INEA-GERLAB-212 – Acondicionamento e Preservação de Amostra.

6.5 Preparo e tratamento da amostra

Observação: Deve-se utilizar 2 placas de petri para cada amostra a ser analisada

Nota: Caso seja necessário analisar em duplicata, utilizar 4 placas de petri para uma mesma amostra.

Na cabine de segurança biológica, preparar 2 placas de Petri para cada amostra a ser inoculada e proceder as suas identificações: data, diluição, Nº da amostra;

- ✓ Transferir 1,0 mL da amostra homogeneizada (25 vezes) para placa de Petri;
- ✓ Adicionar (12-15 mL) do meio PCA para a placa de Petri contendo a alíquota da amostra inoculada;
- ✓ Realizar homogeneização;

Nota: Evitar a projeção do conteúdo contra as paredes, a tampa e para fora da placa.

- ✓ Após a solidificação do meio, incubar as placas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em posição invertida, durante 48 ± 3 horas;

Nota: Se necessário, diluir a amostra quantas vezes forem necessárias, conforme abaixo:

Na cabine de segurança biológica, pipetar 1,0 mL da amostra homogeneizada (25 vezes) para tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água de diluição;

Repetir o procedimento conforme 9.2.2 a 9.2.5

6.6 Operação / Calibração do equipamento

A operação e calibração dos equipamentos são executadas de acordo com o descrito nos POP-INEA--GERLAB-519 – Operação de Incubadora Bacteriológica, POP-INEA-GERLAB-513 – Operação do Banho Maria, POP-INEA-GERLAB-516 – Operação do Contador de Colônias, POP-INEA-GERLAB-521 – Operação da Cabine de Segurança Biológica, POP-INEA-GERLAB-528 – Operação do Pipetador Automático.

6.7 Medição do analito

A medição do analito é realizada através da observação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas no meio de cultura contido na placa de Petri.

6.8 Validação

De acordo com os critérios definidos no POP-INEA-GERLAB-205 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIO, o referido método não necessita de validação, pois segue método normalizado definido pelo AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Maryland: Port City Press, 24nd Edition. 2023; Method 9215B. Entretanto, com o objetivo de confirmação de exame e fornecimento evidência objetiva de que o método é adequado ao uso pretendido realizou-se o experimento de:

Código: ME-INEA-GERLAB-502	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 3/5
--------------------------------------	---	-----------------------	--------------------------

MÉTODO DE ENSAIO

DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS PELA TÉCNICA “POUR PLATE”

Item	Resultados
Repetitividade (precisão)	<p>No teste de validação várias duplicatas (pelo menos 7) foram utilizadas para se definir o desvio médio absoluto dos logaritmos das concentrações.</p> <p>A partir deste valor as duplicatas foram lançadas em cartas de amplitude para diferenças entre os Logs (10) das concentrações.</p> <p>Os resultados encontram-se declarados nos relatórios de validação emitidos pelo módulo de Validação do LABWIN.</p>

6.9 CONTROLE DE QUALIDADE / CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

Os critérios utilizados para a validação dos dados e controle de qualidade dos resultados analíticos deste método são encontrados nos POP-INEA-GERLAB-204 – Controle De Qualidade Analítica, POP-INEA-DIGAT-GERLAB-206 – Elaboração de Carta de Controle e POP-INEA-GERLAB-510 - Garantia Da Qualidade Dos Ensaos Microbiológicos.

6.10 CÁLCULOS E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Deve-se seguir o procedimento descrito no POP-INEA-GERLAB-317 – Registro de Resultados (Laboratório) e POP-INEA-GERLAB-510 - Garantia da Qualidade dos Ensaos Microbiológicos

Selecionar para leitura das placas correspondentes ao volume inoculado que apresente uma contagem entre **30 e 300** colônias. Contar as colônias com auxílio do contador de colônias e calcular a média aritmética das contagens. Em caso de amostras diluídas, considerar o fator de diluição na expressão dos resultados.

Exemplo: Para uma amostra, cujo volume selecionado foi 0,01 (diluição 10^{-2}) e os valores obtidos foram 50 e 48 colônias, calcular conforme descrito abaixo:

$$\frac{50 + 48 \times 100}{2} = 4.900 \text{ U.F.C./mL}$$

Se, porém, de todas as diluições, nenhuma placa apresentar colônia, considerar o resultado como menor que um (< 1) multiplicado pela diluição correspondente.

Exemplo: Para uma amostra, cujo volume selecionado foi 0,01 (diluição 10^{-2}), o resultado será:

$$<100 \text{ U.F.C./mL}$$

Expressar o resultado em Unidades Formadoras de Colônias de bactérias heterotróficas por mililitro (U.F.C./mL).

Se a contagem for superior a 300 nas placas de maior diluição e houver menos de 10 colônias por cm^2 , deve-se efetuar a contagem em 19 quadrados com 1 cm^2 cada, (sendo 10 quadrados na horizontal e 9 na vertical) utilizando as marcações do contador de colônias.

Expressar o resultado como:

Estimado U.F.C./mL.

Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem mais que 100 colônias por cm^2 expressar o resultado como:

Estimado $>5700 \text{ U.F.C./mL}$ para placas de plástico e;

Estimado $>6500 \text{ U.F.C./mL}$ para placas de vidro;

Nota: Sempre considerar a diluição correspondente

Exemplo: Para uma amostra, cujo volume selecionado foi 0,01 (diluição 10^{-2}), o resultado será:

>570.000 U.F.C./mL

6.11 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A Estimativa da Incerteza de Medição foi calculada de acordo com o DOQ-CGCRE-53_00 - Incerteza de medição em microbiologia, e arquivada na área compartilhada (t).

7 REGISTROS

FRM-POP-INEA-GERLAB-510-04 – Livro de registros de amostras

8 ANEXOS

Não se aplica.

9 HISTÓRICO DAS REVISÕES

- Primeira edição / Versão 0
- Segunda edição / Versão 1
 - ✓ Substituição do termo DIMFIS por DIGAT
 - ✓ Atualização dos itens 3, 4, 5, 9 e 12;
 - ✓ Inclusão do item 12.1 **Estimativa da Incerteza de Medição**
- Terceira edição / Versão 3
 - ✓ Atualização conforme POP-INEA-GERLAB-104.
 - ✓ Adicionado o campo de Responsabilidade

Atualização para adequação ao POP-INEA-GERLAB-104 e NOI-INEA-01-R1.