

1 OBJETIVO

Definir o método de determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes em amostras de águas e efluentes, pela técnica dos tubos múltiplos realizado nas atividades do Setor de Análises Microbiológicas do SERVAB-Serviço de análises Biológicas.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO E VIGÊNCIA

Este método é aplicável na determinação de Coliformes Termotolerantes em águas. A vigência deste documento se dará a partir da data de aprovação.

3 TERMOS E DEFINIÇÕES

TERMO / SIGLA	OBJETO
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
GERLAB	Gerência de Análises Laboratoriais
SERVAB	Serviço de Análises Microbiológicas
SERVQUAL	Serviço de Controle da Qualidade
ME	Método de Ensaio
POP	Procedimento Operacional Padrão
Água de diluição	Solução contendo sais minerais utilizada para diluição de amostras
Inóculo	Alíquota de amostra, ou substância, contendo ou não microrganismos empregados na inoculação.
Meio de cultura	Associação equilibrada de agentes químicos (nutrientes, pH, etc.) e físicos (temperatura, viscosidade, atmosfera, etc.) que permitem o cultivo de microrganismos fora de seu “habitat” natural.
Coliformes Termotolerantes	Bactérias Gram-negativas, em forma de bacilos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativa, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β - galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros <i>Escherichia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> e <i>Enterobacter</i> , embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo.

4 REFERÊNCIAS

4.1 Documento Normativo

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Maryland: Port City Press, 24nd ed., 2023; Method 9221-E2.

4.2 Documentos Complementares

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

POP-INEA-GERLAB-204 – Controle de qualidade analítica

Código: ME-INEA-GERLAB-503	Data de aprovação: 25/03/2024	Revisão: 04	Paginação: 1/8
-------------------------------	----------------------------------	----------------	-------------------

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-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 RESPONSABILIDADES 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-DIGAT-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;
- Pipeta ou micropipeta;
- Incubadora bacteriológica;
- Banho-maria;

6.3 Reagentes, soluções e padrões

- Água de Diluição: Água Peptonada Tamponada 0,1%;
- Meio de cultura A1 simples e/ou duplo.
- Cultura de trabalho da cepa padrão ATCC Escherichia coli, ou

Código: ME-INEA-GERLAB-503	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 2/8
--------------------------------------	---	-----------------------	--------------------------

- Cultura de trabalho da cepa padrão ATCC Enterococcus faecalis

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.

Preparo e tratamento da amostra

Em estante apropriada, dispor, no mínimo, três (3) séries de cinco (5) tubos de meio por amostra;

- Homogeneizar a amostra (25 vezes);
- Pipetar 10mL da amostra homogeneizada (25 vezes) para frasco contendo 90mL de água de diluição, ou pipetar 1,0mL da amostra homogeneizada (25 vezes) para frasco/tubo contendo 9,0mL de água de diluição, fazendo a primeira diluição (10-1);

Nota: Caso utilize meio A1 concentração dupla, transferir 10,0mL da amostra homogeneizada (25 vezes) para cada tubo;

- Inocular 1,0mL da amostra em cada um dos cinco (5) tubos contendo meio A1 de concentração simples;
- Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição;
- Pipetar 10mL do frasco contendo a primeira diluição para outro frasco contendo 90 mL de água de diluição, ou pipetar 1,0mL do frasco contendo a primeira diluição para outro frasco contendo 9,0 mL de água de diluição fazendo a segunda diluição (10-2)
- Inocular 1,0mL da primeira diluição (10-1) homogeneizada (25 vezes) em cada um dos cinco (5) tubos contendo meio A1 de concentração simples;
- Homogeneizar o frasco contendo a segunda diluição
- Inocular 1,0mL da segunda diluição (10-1) em cada um dos cinco (5) tubos

Nota¹: Utilizar tantas vezes forem necessárias estas diluições seriadas com coeficiente 1:10.

Nota²: Na primeira coleta de determinada amostra de água bruta, utilizar 4 series de 5 tubos e começar a inoculação pela amostra. No caso de efluentes sanitários, utilizar 4 series de 5 tubos e começar a inoculação pela primeira diluição.

- Incubar todos os tubos inoculados em estufa incubadora sorológica a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 3 horas.
- Transferir os tubos da incubadora para um banho-maria a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, para a continuidade da incubação durante 21 ± 2 horas.

Operação / Calibração do equipamento

A operação e calibração dos equipamentos são executadas de acordo com o descrito nos POP-INEA - GERLAB-519 de estufa incubadora bacteriológica, POP-INEA-DIGAT-GERLAB-521 cabine de segurança biológica, POP-INEA-GERLAB-528 pipetador automático, POP-INEA-DIGAT-GERLAB-513 banho maria.

Medição do analito

A medição do analito é através da fermentação a lactose que gera o aparecimento de bolha no tubo de Durhan.

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 ed., 2024; Method 9221-E2. 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-503	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 3/8
-------------------------------	----------------------------------	----------------	-------------------

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>

Controle de qualidade / Critérios de aceitação

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

Cálculos e expressão dos resultados

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

Calcular a densidade de coliformes termotolerantes, que é expressa em NMP por 100 mL da amostra.

A estimativa do NMP/100 mL é feita através de consulta à Tabela de Número Mais Provável por 100 mL, computando-se os tubos positivos das três (3) diluições consideradas críticas, isto é, aquelas em que há transição de tubos positivos para tubos negativos.

Selecionar apenas as diluições que apresentarem todos os tubos da série positivos.

Para selecionar as 3 diluições a serem usadas no cálculo, partir da maior diluição que apresentar todos os tubos positivos.

Exemplo:

EX	DILUIÇÃO (VOLUME, EM mL)					COMBINAÇÃO DE POSITIVOS	NMP/100mL
	E	10	1	10^{-1} (0,1)	10^{-2} (0,01)		
M				10^{-3} (0,001)			
P							
L							
O							
A	5	5	1	0	0	X-5-1-0-X	330
B	4	5	1	0	0	4-5-1-X-X	48
C	5	2	5	2	1	X-X-5-2-1	7000
D	4	5	4	5	1	X-X-4-5-1	4800
E	5	4	4	0	1	X-4-4-1-X	400
F	4	3	0	1	1	4-3-2-X-X	39
G	4	3	3	2	1	X-X-3-2-1	1700

Notar que a tabela de NMP refere-se às inoculações de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL. Quando diluições maiores são realizadas, os resultados devem ser multiplicados pelo número de vezes que a amostra for diluída.

Estimativa da incerteza de medição

Código: ME-INEA-GERLAB-503	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 4/8
-------------------------------	----------------------------------	----------------	-------------------

Não é necessário o cálculo da Estimativa da Incerteza de Medição dos ensaios de coliformes termotolerantes pois a tabela especifica os limites para os valores das principais fontes de incerteza de medição e especifica a forma de apresentação de resultados calculados.

Apesar da não obrigatoriedade, a Estimativa da Incerteza de Medição foi calculada de acordo com o DOQ-GCIRE-53_00 - Incerteza de medição em microbiologia, e arquivada na área compartilhada (t).

7. REGISTROS

FRM-POP-GERLAB-510-01 – Livro de registro de amostras

FRM-POP-GERLAB-510-02 – Livro de registro de amostras

8. ANEXOS

ANEXO 01 - Tabela 9221: IV – Número Mais Provável (NMP)

9. HISTÓRICO DAS REVISÕES

- Primeira edição / Versão 0
- Segunda edição / Versão 1
 - ✓ Substituição do termo DIMFIS por DIGAT;
 - ✓ Inclusão da matriz Efluente no item 2;
 - ✓ Atualização dos itens 3, 4; 5; 6, 9.1.2; 9.2, 12 e 13;
 - ✓ Inclusão do item 12.1 Estimativa da Incerteza de Medição;
- Terceira edição / Versão 3
 - ✓ Atualização das normas vigentes no item 4 – Referências;
 - ✓ Atualização conforme POP-INEA-GERLAB-104;
 - ✓ Adicionado o campo de responsabilidades.
- Terceira edição / Versão 4
 - Atualização de adequação ao POP-INEA-GERLAB-104 e NOI-INEA-01-R1.

ANEXO 01 - Tabela 9221: IV – Número Mais Provável (NMP)

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados			Índice de NMP por 100 mL	Limites de confiança 95%	
5 tubos de 10 mL	5 tubos de 1 mL	5 tubos de 0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	<1,8	--	6,8
0	0	1	1,8	0,09	6,8
0	1	0	1,8	0,09	6,9
0	1	1	3,6	0,7	10
0	2	0	3,7	0,7	10
0	2	1	5,5	1,8	15
0	3	0	5,6	1,8	15
1	0	0	2	0,1	10
1	0	1	4	0,7	10
1	0	2	6	1,8	15
1	1	0	4	0,71	12
1	1	1	6,1	1,8	15
1	1	2	8,1	3,4	22
1	2	0	6,1	1,8	15
1	2	1	8,2	3,4	22
1	3	0	8,3	3,4	22
1	3	1	10	3,5	22
1	4	0	10	3,5	22
2	0	0	4,5	0,79	15
2	0	1	6,8	1,8	15
2	0	2	9,1	3,4	22
2	1	0	6,8	1,8	17
2	1	1	9,2	3,4	22
2	1	2	12	4,1	26
2	2	0	9,3	3,4	22
2	2	1	12	4,1	26
2	2	2	14	5,9	36
2	3	0	12	4,1	26
2	3	1	14	5,9	36
2	4	0	15	5,9	36
3	0	0	7,8	2,1	22
3	0	1	11	3,5	23
3	0	2	13	5,6	35
3	1	0	11	3,5	26
3	1	1	14	5,6	36

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados	Índice de NMP por 100 mL	Limites de confiança 95%	
		Inferior	Superior
5 tubos de 10 mL	5 tubos de 1 mL	5 tubos de 0,1 mL	
3	1	2	17
3	2	0	14
3	2	1	17
3	2	2	20
3	3	0	17
3	3	1	21
3	3	2	24
3	4	0	21
3	4	1	24
3	5	0	25
4	0	0	13
4	0	1	17
4	0	2	21
4	0	3	25
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26
4	1	3	31
4	2	0	22
4	2	1	26
4	2	2	32
4	2	3	38
4	3	0	27
4	3	1	33
4	3	2	39
4	4	0	34
4	4	1	40
4	4	2	47
4	5	0	41
4	5	1	48
5	0	0	23
5	0	1	31
5	0	2	43
5	0	3	58
5	1	0	33
5	1	1	46

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES PELA TÉCNICA
“TUBOS MÚLTIPLOS”

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados	Índice de NMP por 100 mL	Limites de confiança 95%	
		Inferior	Superior
5 tubos de 10 mL	5 tubos de 1 mL	5 tubos de 0,1 mL	
5	1	2	63 22 150
5	1	3	84 34 220
5	2	0	49 15 150
5	2	1	70 22 170
5	2	2	94 34 230
5	2	3	120 36 250
5	2	4	150 58 400
5	3	0	79 22 220
5	3	1	110 34 250
5	3	2	140 52 400
5	3	3	170 70 400
5	3	4	210 70 400
5	4	0	130 36 400
5	4	1	170 58 400
5	4	2	220 70 440
5	4	3	280 100 710
5	4	4	350 100 710
5	4	5	430 150 1100
5	5	0	240 70 710
5	5	1	350 100 1100
5	5	2	540 150 1700
5	5	3	920 220 2600
5	5	4	1600 400 4600
5	5	5	>1600 700 --