

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

1 OBJETIVO

Definir o método de determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e *Escherichia coli* em 24 horas, com aplicação para amostras de águas, pela técnica dos tubos múltiplos, empregando o meio de cultura Fluorocult LMX ou similar, realizado nas atividades do Setor de Análises Microbiológicas -do Serviço de análises biológicas-SERVAB.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO E VIGÊNCIA

Este método se aplica a amostras provenientes de águas. 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
Coliformes totais	Bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, que fermentam a lactose com produção de gás e ácido dentro de 48 horas a 35 – 37 ($\pm 0,5$) °C. Neste grupo estão incluídos 4 (quatro) gêneros da família <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> e <i>Enterobacter</i> .
<i>Escherichia coli</i>	Bactérias do grupo Coliformes, bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que apresentam a propriedade de produzir fluorescência, dentro de 24 horas a 35 – 37 ($\pm 0,5$)°C, em meio de cultura com substratos cromogênico e fluorogênico.
Fluorocult LMX	Meio de cultura seletivo e diferencial no qual estão integrados substratos cromogênico e fluorogênico. A identificação de enzimas bacterianas características, mediante substratos cromogênicos e fluorogênicos oferece a possibilidade de uma rápida identificação desses microrganismos. Este meio de cultura é utilizado para a determinação simultânea de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> , através da técnica de tubos múltiplos, a uma temperatura de 35 ($\pm 0,5$) °C durante 24 horas.
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
Número Mais Provável (NMP)	Estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos mediante a técnica dos tubos múltiplos.
POP	Procedimento Operacional Padrão
SERVAB	Serviço de Análises Biológicas
SERVQUAL	Serviço de Qualidade

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

TERMO / SIGLA	OBJETO
Teste de Indol	Esse teste tem a finalidade de determinar a produção de indol por microrganismos. Diversos microrganismos são capazes de clivar o triptofano, com produção de ácido pirúvico, amoníaco e indol. O indol reage com o 4-dimetilaminobenzaldeído produzindo uma cor vermelho escuro. O reativo de Kovacs é empregado nessa determinação. A <i>Escherichia coli</i> apresenta reação positiva para esse teste.

4 REFERÊNCIAS

4.1 Documento Normativo

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Maryland: Port City Press, 24nd Edition., 2023; Method 9223B2a.

US Environmental Protection Agency, **Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water**, Fifth Edition, January 2005, EPA 815-R-05-004

4.2 Documentos Complementares

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

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

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

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

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

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

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

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

POP-INEA-GELAB-510 - Garantia da Qualidade dos Ensaos Microbiológicos

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

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

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

POP-INEA-GELAB-524 – Operação Lâmpada Ultravioleta (UV).

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

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

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

IT-INEA-GELAB-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-GELAB-1101- Medidas gerais de segurança e prevenção de acidentes.

6.2 Equipamentos e Materiais

- ✓ Pipetador
- ✓ Tubo de ensaio;
- ✓ Cabine de segurança biológica;
- ✓ Pipeta ou Ponteira
- ✓ Incubadora bacteriológica;
- ✓ Lâmpada Ultravioleta – 365nm;

6.3 Reagentes, Soluções e Padrões

- ✓ Meio de cultura Fluorocult LMX ou similar;
- ✓ Água de Diluição: Água Peptonada Tamponada 0,1%;
- ✓ Cultura de trabalho da cepa padrão *Escherichia coli*, ou
- ✓ Cultura de trabalho da cepa padrão *Enterococcus faecalis*
- ✓ Reativo de Kovac's.

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-GELAB-212 – Acondicionamento e Preservação de Amostra.

6.5 Operação / Calibração dos equipamentos

A operação e calibração dos equipamentos são executadas de acordo com o descrito nos POP-INEA-DIGAT-GELAB-519 de estufa incubadora bacteriológica, POP-INEA-DIGAT-GELAB-521 cabine de segurança biológica, POP-INEA-DIGAT-GELAB-528 Pipetador automático e POP-INEA-DIGAT-GELAB-524 - operação da lâmpada ultravioleta (UV).

6.6 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, fazendo a primeira diluição (10^{-1}) 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});

Inocular 10,0mL da amostra em cada um dos cinco (5) tubos contendo meio de concentração dupla;

Inocular 1,0mL da amostra em cada um dos cinco (5) tubos contendo meio 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, 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 de concentração simples;

Homogeneizar o frasco contendo a segunda diluição

Inocular 1,0mL da segunda diluição (10^{-2}) em cada um dos cinco (5) tubos

MÉTODO DE ENSAIO

DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI* PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS MÚLTIPLOS

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

Incubar todos os tubos inoculados em estufa incubadora sorológica a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

6.7 Medição do analito

Coliformes Totais:

Após o período de incubação das amostras, proceder à leitura, considerando como resultado positivo para o teste todos os tubos que apresentaram cor verde azulada.

Escherichia coli

Os tubos positivos para o teste de coliformes totais devem ser observados com uma luz UV 365nm. São considerados, como resultado positivo para *E. coli*, os tubos que apresentarem fluorescência azul.

Como teste confirmatório adicionar algumas gotas (2-10) do reativo de Kovacs nos tubos que apresentaram fluorescência. Os tubos que apresentarem um halo vermelho na superfície do meio de cultura com crescimento são considerados como Indol positivos.

6.8 Validação

De acordo com os critérios definidos no POP-INEA-GELAB-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., 2023, Method 9223. 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:

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 destes métodos são encontrados nos POP-INEA-GELAB-204 – Controle De Qualidade Analítica, POP-INEA-GELAB-206 – Elaboração de Carta de Controle e POP-INEA-DIGAT-GELAB-510 - Garantia Da Qualidade Dos Ensaio Microbiológicos.

6.10 Cálculos e Expressão dos Resultados

A partir dos resultados obtidos, calcular a densidade de coliformes totais e *Escherichia coli*, sendo o resultado expresso em NMP por 100 mL da amostra (NMP/100mL).

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:

Código: ME-INEA-GERLAB-506	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 4/9
--------------------------------------	---	-----------------------	--------------------------

MÉTODO DE ENSAIO

DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS MÚLTIPLOS

EXEMPLO	DILUIÇÃO (VOLUME, EM mL)					COMBINAÇÃO DE POSITIVOS	NMP/100mL
	10	1	10 ⁻¹ (0,1)	10 ⁻² (0,01)	10 ⁻³ (0,001)		
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 feitas, os resultados devem ser multiplicados pelo número de vezes que a amostra foi diluída.

6.11 Estimativa da incerteza de medição

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-CGCRE-53_00 - Incerteza de medição em microbiologia, e arquivada na área compartilhada (t).

7 REGISTROS

FRM-POP-INEA-GELAB-510_Rev 03 – 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
 - Mudança de Título
 - Substituição do termo DIMFIS por DIGAT;
 - Inclusão da matriz Efluente no item 2.
 - Atualização dos itens 4; 5; 6, 9.1.2; 9.2, 12 e 13;
 - Inclusão do item 12.1 Estimativa da Incerteza de Medição
- Terceira edição / Versão 2
 - Atualização das normas vigentes no item 4 – Referências;
 - Atualização conforme POP-INEA-GELAB-104.
- Quarta edição/Versão 03
 - Atualização da versão do Standart Methods 24 2023
 - Adicionado o campo de responsabilidades

Código: ME-INEA-GERLAB-506	Data de aprovação: 06/12/2024	Revisão: 04	Paginação: 5/9
--------------------------------------	---	-----------------------	--------------------------

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

- Adequação ao pop-inea-104

Quinta edição/Versão 04

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

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

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

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

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
3	1	2	17	6	36
3	2	0	14	5,7	36
3	2	1	17	6,8	40
3	2	2	20	6,8	40
3	3	0	17	6,8	40
3	3	1	21	6,8	40
3	3	2	24	9,8	70
3	4	0	21	6,8	40
3	4	1	24	9,8	70
3	5	0	25	9,8	70
4	0	0	13	4,1	35
4	0	1	17	5,9	36
4	0	2	21	6,8	40
4	0	3	25	9,8	70
4	1	0	17	6	40
4	1	1	21	6,8	42
4	1	2	26	9,8	70
4	1	3	31	10	70
4	2	0	22	6,8	50
4	2	1	26	9,8	70
4	2	2	32	10	70
4	2	3	38	14	100
4	3	0	27	9,9	70
4	3	1	33	10	70
4	3	2	39	14	100
4	4	0	34	14	100
4	4	1	40	14	100
4	4	2	47	15	120
4	5	0	41	14	100
4	5	1	48	15	120
5	0	0	23	6,8	70
5	0	1	31	10	70
5	0	2	43	14	100
5	0	3	58	22	150
5	1	0	33	10	100
5	1	1	46	14	120

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI
PELO MÉTODO DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO – TUBOS
MÚLTIPLOS

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
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	--