

CONTROLE E GARANTIA DA QUALIDADE NAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO

Procedimentos e Critérios

SÉRIE RELATÓRIOS 2007

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
United States Environmental Protection Agency - USEPA



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
José Serra
Governador

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
Xico Graziano
Secretário

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Feranando Rei
Diretor Presidente

São Paulo
2007



Feranando Rei
Diretor Presidente

Edson Tomaz de Lima Filho
Diretor de Gestão Corporativa

Otávio Okano
Diretor de Controle de Poluição Ambiental

Marcelo de Souza Mineli
Diretor de Engenharia, Tecnologia e Qualidade Ambiental

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

Diretoria de Engenharia, Tecnologia e Qualidade Ambiental
Marcelo de Souza Mineli

Coordenação Geral
Biom. Maria Inês Zanolli Sato
Departamento de Análises Ambientais

Coordenação Técnica
Farm. Bioq. Elayse Maria Hachich
Setor de Microbiologia e Parasitologia

Equipe Técnica
Biól. Nancy de Castro Stoppe
Farm. Bioq. Solange Rodrigues Ramos

Projeto Gráfico e Editoração Eletrônica
CETESB/Grupo de Eventos
Rogério Mendes

FICHA CATALOGRÁFICA

CONTROLE E GARANTIA DA QUALIDADE NAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS
DE ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO

Procedimentos e Critérios

Quinta Edição

Substitui: EPA/ 570/9-90/008, abril 1990

EPA 814-B-92/002, setembro 1992

EPA 570/9-90-008A, outubro 1991

EPA 815-B-97-001, março 1997

US Environmental Protection Agency
Office of Water
Office of Ground Water and Drinking Water
Technical Support Center
Cincinnati, Ohio 45268

para quem não tem fluência na língua inglesa

uma importante ferramenta para avaliação técnica laboratorial

O "Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water" é uma publicação da Agência Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency - USEPA), que estabelece os procedimentos técnicos e critérios para a garantia da qualidade laboratorial das análises químicas, microbiológicas e radioquímicas de águas de consumo humano. A USEPA desenvolve um Programa de Certificação dos laboratórios que realizam essas análises segundo os requisitos estabelecidos no Manual.

Há vários anos os Laboratórios de Microbiologia da CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental adotam os procedimentos e critérios do Manual, que é também utilizado no Curso "Controle de Qualidade Analítica em Laboratórios de Análises Microbiológicas da Água", ministrado anualmente pelo Setor de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Análises Ambientais da CETESB, como importante ferramenta para avaliação técnica laboratorial. No ano de 2005, foi disponibilizada a tradução do Capítulo V (Microbiologia), da 4ª edição de 1997 desse Manual para os profissionais que atuam na área e não têm fluência na língua inglesa. Nessa época, a 5ª edição, de 2005, já tinha sido publicada pela USEPA, e assumimos então o compromisso de disponibilizar assim que possível sua tradução.

Destaca-se nessa edição a inclusão de métodos utilizados para avaliação da qualidade de águas subterrâneas (colifagos e enterococos) e novos métodos de análise baseados em substratos enzimáticos, que são atualmente permitidos pela legislação americana (Anexo G- Analytical Methods for Microbiology).

A versão integral desta publicação da USEPA, que contém, dentre outros, capítulos referentes à Química e Radioquímica pode ser consultada no endereço eletrônico www.epa.gov/safewater/labcert/pdfs/manual_labcert_2005.pdf.

SUMÁRIO

ELEMENTOS CRÍTICOS PARA MICROBIOLOGIA

1 – Pessoal.....	1
1.1 Supervisor/Consultor.....	1
1.2 Analista.....	1
1.3 Dispensa de exigência de treinamento.....	2
1.4 Registros pessoais.....	2
2 – Instalações laboratoriais.....	2
3 – Equipamentos e suprimentos para o laboratório.....	2
3.1 Medidor de pH.....	2
3.2 Balança de topo.....	3
3.3 Instrumentos de controle de temperatura.....	3
3.4 Incubadora.....	4
3.5 Autoclave.....	5
3.6 Estufa de esterilização e secagem.....	5
3.7 Contador de colônias.....	5
3.8 Condutivímetro.....	5
3.9 Geladeira.....	5
3.10 Instrumentos para inoculação.....	5
3.11 Equipamentos para a técnica de membrana filtrante.....	6
3.12 Placas de Petri.....	6
3.13 Pipetas.....	6
3.14 Vidraria e material plástico.....	7
3.15 Frascos de coleta.....	7
3.16 Lâmpada ultravioleta.....	7
3.17 Espectrofotômetro ou colorímetro.....	8
4 – Procedimentos laboratoriais.....	8
4.1 Procedimentos para esterilização.....	8
4.2 Frascos de coleta.....	9
4.3 Água purificada.....	9
4.4 Água de diluição/água de enxágüe.....	10
4.5 Lavagem de vidraria.....	10

5 – Metodologia analítica.....	10
5.1 Instruções gerais.....	10
5.2 Métodos baseados na fermentação em meios líquidos.....	15
5.3 Testes com substratos enzimáticos (cromogênicos e fluorogênicos).....	19
5.4 Métodos baseados na técnica de membrana filtrante (MF).....	24
5.5 Contagem de bactérias heterotróficas (para quantificação em águas de consumo humano).....	30
5.6 Colifagos.....	32
6 – Coleta, manipulação e conservação de amostras.....	39
6.1 Coletor.....	39
6.2 Amostragem.....	39
6.3 Conservação das amostras a baixa temperatura.....	39
6.4 Validade das amostras.....	40
6.5 Formulário com informações sobre a amostra.....	40
7 – Garantia da Qualidade.....	41
8 – Registro e relatórios de resultados.....	42
9 – Ações em resposta a resultados laboratoriais.....	43
Anexos.....	45
Referências.....	50
Lista de verificação.....	51

Elementos Críticos para Microbiologia

Nota 1: Neste trabalho emprega-se “deve ter” , ou “deve manter” quando se faz referência a critérios de certificação requeridos pela “National Primary Drinking Water Regulations”. Usa-se “recomenda-se” ou o verbo no modo infinitivo, se a referência for feita a procedimentos que, embora não obrigatórios, são considerados boas práticas de laboratório. Para assegurar a validade dos dados, é fundamental que os laboratórios observem critérios legais e não-legais. Os auditores têm a prerrogativa de negar a certificação, caso julguem insatisfatórios ou insuficientes os dados de controle de qualidade.

Nota 2: Os itens de controle de qualidade assinalados com **CQ** exigem registro escrito. Recomenda-se que cada registro contenha as iniciais do analista e a data.

Nota 3: As referências ao “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” dizem respeito à 18ª, 19ª e 20ª edições (exceto quando houver menção diferente).

1. Pessoal

1.1 Supervisor/Consultor

Recomenda-se que o supervisor do Laboratório de Microbiologia tenha grau de bacharel em Microbiologia, Biologia ou curso semelhante, e que os supervisores não graduados em Microbiologia tenham tido na faculdade pelo menos uma disciplina que incluísse aulas práticas de Microbiologia e a área de Microbiologia Ambiental. Recomenda-se que, além disso, o supervisor tenha recebido um mínimo de duas semanas de treinamento em laboratório de análises microbiológicas da água de consumo humano da entidade responsável federal, estadual ou instituição acadêmica ou tenha experiência (com vínculo empregatício) de 80 horas nessa área em laboratório certificado ou outro treinamento aceito pelo Estado ou pela EPA. Se não houver um supervisor (nem dispensa desse funcionário, conforme especificado no item 1.3), um consultor com as mesmas qualificações pode substituí-lo, desde que o Laboratório possua documentação comprobatória de sua aceitação pelo Estado e que ele esteja presente no Laboratório com a frequência desejada para desempenhar suas funções de supervisor.

O supervisor do laboratório tem sob sua responsabilidade garantir que os analistas são capazes de executar satisfatoriamente as análises sob sua atribuição e que os dados gerados pelo laboratório tenham qualidade e atendam aos critérios exigidos pelas entidades responsáveis.

1.2 Analista (ou cargo equivalente)

Recomenda-se que o analista seja capaz de executar as análises microbiológicas com supervisão mínima, tenha o 2º grau e no mínimo três meses de experiência de bancada em microbiologia de água, leite ou alimentos. Recomenda-se que tenha também treinamento aceito pelo Estado ou pela EPA em análises microbiológicas de água de consumo humano, e experiência mínima de 30 dias (com vínculo empregatício) nessa área, sob a supervisão de um analista experiente, e que participe de “workshops” e programas de treinamento proporcionados pela entidade responsável, associações profissionais e fabricantes. Recomenda-se que o analista comprove sua capacidade de produzir resultados aceitáveis para poder analisar amostras para atendimento a padrões de qualidade.

1.3 Dispensa da exigência de treinamento

O auditor pode dispensar o treinamento acadêmico acima especificado, de acordo com o caso, para analistas muito experientes. Essa dispensa também pode ser concedida a supervisores de laboratório de empresas de sistemas de água de consumo humano que analisam somente sua própria água. Quando essa dispensa é concedida, o auditor redige e assina uma justificativa com cópia para o Laboratório, que permanece disponível para inspeção.

1.4 Registros pessoais

Recomenda-se que os registros pessoais que incluem formação acadêmica, cursos especializados e tipos de análises microbiológicas realizadas sejam mantidos com os analistas.

2. Instalações laboratoriais

Recomenda-se que o Laboratório esteja instalado em área limpa, com temperatura e umidade controladas e iluminação adequada na parte superior das bancadas. Recomenda-se igualmente uma separação física entre áreas com atividades incompatíveis, e mínima circulação de pessoal, para assegurar que nenhum tipo de contaminação afete a qualidade dos dados. Em bancadas e pisos devem ser empregados materiais de fácil limpeza e desinfecção. É necessário espaço suficiente para processamento de amostras, armazenamento de meios de cultura, vidraria e equipamento portátil, equipamentos de piso (incubadoras, geladeiras etc.), áreas para lavagem de vidraria e esterilização de material, e todos os recursos para descarte de resíduos microbiológicos.

3. Equipamentos e suprimentos para o Laboratório

O Laboratório deve ter os equipamentos e materiais necessários à realização das análises para as quais requer certificação.

3.1 Medidor de pH

3.1.1 Manter exatidão e graduação da escala de $\pm 0,1$ unidade.

3.1.2 Utilizar alíquotas do tampão apenas uma vez.

3.1.3 Manter os eletrodos de acordo com as recomendações do fabricante.

CQ 3.1.4 Calibrar o aparelho, a cada período de uso, com tampão padrão pH 7,0, 4,0 ou 10,0, conforme o pH do meio de cultura ou reagente que está sendo preparado. Os resultados e os tampões utilizados devem ser registrados no “logbook” do equipamento juntamente com as iniciais do analista.

CQ 3.1.5 Registrar a inclinação (“slope”) do medidor de pH mensalmente, após a calibração.

3.1.5.1 Se o equipamento não calcula automaticamente a inclinação mas tem a leitura de pH em milivolts (mV), utilizar a seguinte fórmula para calcular a inclinação:

$$\text{Inclinação (em \%)} = [\text{mV a pH 7,0} - \text{mV a pH 4,0}] \times 100 / 177$$

3.1.5.2 Se a inclinação estiver abaixo de 95% ou acima de 105%, o medidor ou o eletrodo necessitam de manutenção. Seguir as instruções do fabricante para manutenção e limpeza geral do eletrodo.

CQ 3.1.6 Datar a solução tampão no recebimento e na abertura dos frascos. Descartar antes da data de validade.

3.2 – Balança de topo

3.2.1 Exatidão de 0,1g.

3.2.2 Sensibilidade mínima de 0,1g para uma carga de 150g, e de 1mg para uma carga igual ou inferior a 10g.

CQ 3.2.3 Calibrar mensalmente com pesos ASTM (American Society of Testing and Materials) na Classe 1, 2 ou 3 (mínimo de três pesos rastreáveis equivalentes às necessidades de pesagem do laboratório, com leitura de 0,1g) (ASTM, 1916 Race St., Philadelphia, PA 19103). Recomenda-se calibrar pesos não rastreáveis a cada seis meses com pesos de referência. Registrar as calibrações no “logbook” do equipamento, juntamente com as iniciais do analista. Os valores para correção devem estar disponíveis para utilização. O peso de referência deve ser verificado a cada cinco anos. Substituir pesos danificados ou corroídos.

CQ 3.2.4 Manter protocolos para a manutenção (interna ou contratos), e registros dos reparos realizados. Recomenda-se que a manutenção, calibração e limpeza sejam feitas pelo menos anualmente, por um técnico qualificado independente. Nos casos em que a localização do Laboratório torna essa visita impraticável o auditor poderá dispensá-la.

3.3 Instrumentos de controle da temperatura

3.3.1 Termômetros de vidro, analógicos ou eletrônicos devem ser graduados em incrementos de 0,5°C (incrementos de 0,2°C para as análises que utilizam a temperatura de incubação de 44,5±0,2°C) ou menos, exceto para as estufas de esterilização e secagem (3.6.1) e geladeiras (3.9.1). A coluna de mercúrio não deve apresentar descontinuidade. Termômetros analógicos que não possam ser calibrados não devem ser utilizados.

CQ 3.3.2 Realizar a calibração dos termômetros de vidro e eletrônicos anualmente, e a dos termômetros analógicos quatro vezes ao ano, na temperatura utilizada, com um termômetro de referência rastreável ao “National Institute of Standards and Technology” (NIST) ou com outro que atenda aos requisitos da NBS Monograph SP 250-23. Indicar o fator e a data de calibração no termômetro, e registrar em caderno apropriado para registro de **CQ** as seguintes informações:

- número de série do termômetro
- número de série do termômetro rastreável ao NIST (ou a outro termômetro de referência)
- temperatura do termômetro
- temperatura do termômetro rastreável ao NIST (ou a outro termômetro de referência)
- fator de correção (ou calibração)

- data da verificação
- iniciais do analista.

CQ 3.3.3 Descartar o termômetro que diferir em mais de 1°C do termômetro de referência. Submeter os termômetros de referência a nova calibração a cada cinco anos e manter o certificado de calibração.

CQ 3.3.4 Calibrar anualmente os instrumentos de registro contínuo de temperatura utilizados nas incubadoras com um termômetro de referência que atenda às especificações do item 3.3.2.

3.4 Incubadora

3.4.1 As incubadoras devem ter um dispositivo interno para controle da temperatura e manter a temperatura especificada pelo método utilizado, geralmente $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Em incubadoras grandes (mais de duas prateleiras), colocar os termômetros nas prateleiras superiores e inferiores, com o bulbo imerso em líquido se houver essa orientação do fabricante (com exceção dos termômetros eletrônicos). Quando for utilizado um incubador de bloco sólido, de alumínio, tubos e placas devem adaptar-se perfeitamente. Os laboratórios que utilizam os métodos baseados no substrato cromogênico e incubadoras com camisa de ar devem observar as especificações do item 5.3.1.5.

CQ 3.4.2 Registrar a temperatura corrigida para cada termômetro em uso pelo menos duas vezes ao dia, nos dias em que a incubadora estiver sendo utilizada, com intervalos de quatro horas, juntamente com data, hora da leitura, temperatura e iniciais do técnico.

3.4.3 A temperatura de incubação de $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ é obtida mais facilmente com um banho-maria equipado com tampa e com circulação de água.

3.5 Autoclave

3.5.1 Utilizar autoclave com fonte interna de calor, sonda de temperatura com sensor na exaustão, sonda de pressão e válvula operacional de segurança que mantenha a temperatura de esterilização durante o ciclo esterilizante e complete esse ciclo (tempo entre colocação dos materiais na autoclave e sua retirada) em 45 minutos quando é utilizado um período de esterilização de 12-15 minutos. Recomenda-se que a autoclave se despressurize lentamente para evitar que o meio borbulhe e não se formem bolhas nos tubos invertidos.

3.5.2 Por motivo de segurança e dificuldades de controle operacional, não se recomenda o uso de painéis de pressão.

CQ 3.5.3 Registrar a data, conteúdo, tempo e temperatura de esterilização, tempo total do ciclo e iniciais do analista. Manter cópias dos protocolos de manutenção interna ou de contratos de serviço e dos registros da manutenção, a ser realizada anualmente no mínimo, e um registro da manutenção mais recente para pronta inspeção.

CQ 3.5.4 Controlar a temperatura, a cada ciclo de autoclavagem com um termômetro de máxima, instrumento eletrônico de leitura ou de registro contínuo para garantir que a temperatura adequada tenha sido atingida e seja registrada. Evitar a sobrecarga. Utilizar fitas ou ampolas contendo esporos mensalmente para confirmar a esterilização. (Como os indicadores químicos irão responder a uma ampla faixa de tempos e temperaturas, ou seja, a um tempo mais longo, bem como a uma

temperatura mais baixa, um resultado positivo com esse indicador não indica necessariamente que a esterilização ocorreu.)

CQ 3.5.5 Verificar com um cronômetro, quatro vezes ao ano, o mecanismo de controle do tempo, registrar os resultados e efetuar as correções necessárias.

3.5.6 Manter as portas da autoclave limpas, sem resíduos de meio de cultura. Recomenda-se que os drenos sejam limpos freqüentemente, retirando-se os resíduos.

3.6. Estufa de esterilização e secagem

3.6.1 Utilizar estufa de esterilização e secagem que mantenha a temperatura estável em 170°-180°C durante duas horas. Evitar a sobrecarga do equipamento. Utilizar termômetro com escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com o bulbo colocado em areia durante o uso.

CQ 3.6.2 Registrar data, conteúdo, tempo e temperatura de esterilização e as iniciais do analista a cada ciclo.

CQ 3.6.3 Utilizar fitas de esporos mensalmente para confirmar a esterilização. Não é recomendado o uso de ampolas porque podem explodir ou derreter.

3.7 Contador de colônias

Utilizar um contador de colônias de campo escuro para contagem das colônias de bactérias heterotróficas.

3.8 Condutivímetro

3.8.1 Utilizar equipamento adequado para controle da água purificada utilizada no Laboratório com leitura em micromhos/cm ou microsiemens/cm.

CQ 3.8.2 Calibrar pelo menos mensalmente, de acordo com as instruções do fabricante, e com padrões de condutividade baixa, certificados e rastreáveis. Se não for possível sua calibração com padrão comercial, determinar a constante da célula mensalmente, segundo o método descrito na Seção 2510 “Condutividade”, do “Standard Methods” (APHA 1998).

3.8.3 Se houver uma unidade do equipamento ligada diretamente ao purificador de água, que não puder ser calibrada, ela não deverá ser utilizada para controle da água purificada.

3.9 Geladeira

3.9.1 Utilizar equipamento que mantenha a temperatura de 1°-5°C e os termômetros calibrados com escala graduada em incrementos de 1°C pelo menos com o bulbo imerso em líquido.

CQ 3.9.2 Quando a geladeira estiver sendo utilizada, e sempre que os analistas estiverem presentes no Laboratório, registrar a temperatura corrigida pelo menos uma vez ao dia.

3.10 Instrumentos para inoculação

Recomenda-se o uso de alças plásticas descartáveis estéreis ou de metal (níquel, cromo ou platina), palitos de madeira (esterilizados por calor seco), “swabs”, ou ponteiros descartáveis estéreis. Para o teste da oxidase, não utilizar as alças de liga de níquel porque podem interferir no teste.

3.11 Equipamentos para a técnica de membrana filtrante

3.11.1 Devem ser utilizados funis de aço inoxidável, vidro, porcelana ou plástico autoclavável que não estejam arranhados nem apresentem vazamento ou sinais de corrosão.

CQ 3.11.2 Se forem utilizadas marcas de graduação nos funis de vidro ou plástico para medir os volumes de amostra, verificar sua exatidão com provetas graduadas Classe B (ou outro tipo de vidraria Classe B) e registrar os resultados.

3.11.3 Utilizar microscópio estereoscópico que forneça ampliação de dez a 15 vezes, com fonte de luz fluorescente, para contagem de colônias (p. ex., colônias com brilho metálico em meios M-Endo ou M-Endo LES).

3.11.4 As membranas devem ser aprovadas pelo fabricante para análise de coliformes totais em águas. Essa aprovação deve basear-se em testes de toxicidade, recuperação, retenção e ausência de substâncias promotoras de crescimento. Devem ser quadriculadas, de 47mm de diâmetro, 0,45µm de porosidade (ou porosidade alternativa, se o fabricante comprovar desempenho igual ou superior às membranas de porosidade de 0,45µm). Recomenda-se que elas sejam brancas e de éster de celulose. Membranas e discos absorventes devem ser adquiridos pré-esterilizados ou autoclavados por dez minutos a 121°C antes do uso.

CQ 3.11.5 Recomenda-se que sejam registrados o número do lote e a data de recebimento das membranas. É necessário assegurar que as membranas não sejam frágeis, nem estejam amassadas, e que o certificado do fabricante acompanhe cada lote.

3.11.6 Recomenda-se a utilização de pinças lisas e de pontas arredondadas.

3.12 Placas de Petri (tampas frouxas ou herméticas)

3.12.1 Recomenda-se a utilização de placas plásticas pré-esterilizadas, ou placas esterilizáveis de vidro. Para manter a esterilidade das placas de vidro, acondicioná-las em recipientes de aço inoxidável ou alumínio, ou embrulhá-las em papel alumínio ou papel resistente ao calor.

3.12.2 Recomenda-se que as placas de tampas frouxas sejam incubadas em recipientes hermeticamente fechados contendo papel toalha umedecido para evitar o ressecamento da membrana e do meio.

3.12.3 Vedar novamente os pacotes de placas descartáveis estéreis entre os intervalos de uso.

3.12.4 Utilizar placas de tamanho adequado de forma que elas possam conter apenas uma membrana por placa.

3.13 Pipetas

3.13.1 Para esterilizar e manter a esterilidade das pipetas de vidro, recomenda-se o uso de recipientes de aço inoxidável ou alumínio, ou embrulhar cada pipeta em papel alumínio ou papel resistente ao calor.

3.13.2 Recomenda-se que as pipetas tenham marcas de graduação legíveis e não apresentem quebras ou trincas.

3.13.3 Vedar novamente os pacotes de pipetas descartáveis estéreis entre os intervalos de uso.

3.13.4 Pipetas de 10mL ou de volumes menores devem ter erro máximo igual ou inferior a 2,5%.

CQ 3.13.5 Podem ser utilizados pipetadores automáticos calibrados com ponteiros estéreis. Recomenda-se que a calibração seja realizada anualmente e os pipetadores com precisão ou exatidão menor que 2,5% sejam reparados ou substituídos.

3.14 Vidraria e material plástico

3.14.1 Recomenda-se o uso de vidro borossilicato ou vidro resistente à corrosão, sem trincas ou quebras, com marcas de graduação legíveis nas provetas e pipetas. Recomenda-se que os materiais em plástico sejam claros e atóxicos para os microrganismos.

CQ 3.14.2 As provetas graduadas utilizadas para medir volumes de amostra devem ter erro igual ou inferior a 2,5%. Em vez de provetas, podem ser usados recipientes pré-calibrados, com marcas de graduação nítidas e erro igual ou inferior a 2,5%.

3.14.3 Recomenda-se que os tubos para fermentação de caldos tenham capacidade suficiente para conter meio e amostra, sem atingir mais de três quartos da capacidade completa.

3.14.4 Recomenda-se que as tampas dos tubos sejam de aço inoxidável, plástico, alumínio ou de rosca com batoques não-tóxicos. Não se recomenda a utilização de tampões de algodão ou espuma.

3.15. Frascos de coleta

3.15.1 Recomenda-se a utilização de frascos de coleta de boca larga, de plástico ou vidro resistente a corrosão, com tampas de vidro que possibilitem fechamento hermético, ou de plástico com batoques atóxicos, autoclaváveis, ou sacos plásticos contendo tiosulfato de sódio. Outros recipientes apropriados podem ser utilizados. Recomenda-se que a capacidade seja de pelo menos 120mL para permitir um espaço livre de 2cm.

3.15.2 Para esterilização, as tampas de vidro devem ser cobertas com papel alumínio ou papel resistente ao calor.

3.15.3 Recomenda-se que os frascos de vidro e de plástico sejam esterilizados por autoclavação. Frascos de vidro também podem ser esterilizados por calor seco. Recomenda-se que os frascos vazios sejam umedecidos com gotas de água antes da autoclavação.

3.15.4 Na análise de amostras de água clorada antes da esterilização deve-se adicionar tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) suficiente para neutralizar todo o cloro residual da amostra (ver Seção 9060A do “Standard Methods” – APHA 1998) - APHA 1998.

3.16 Lâmpada ultravioleta

3.16.1 Recomenda-se que a unidade germicida (254nm) seja limpa mensalmente com pano umedecido com etanol. Recomenda-se que a unidade de comprimento de onda longa (365-366nm) também seja mantida limpa.

CQ 3.16.2 Recomenda-se que a unidade germicida seja testada quatro vezes ao ano com luxímetro ou pela técnica de “Spread Plate” (inoculação em superfície). Recomenda-se que a lâmpada seja substituída se emitir menos que 70% da emissão inicial ou se a placa inoculada que continha 200 a 250 microrganismos, exposta à luz UV por dois minutos, não apresentar redução de 99% na contagem de microrganismos. Outros métodos de avaliação podem ser usados se for comprovado

que são igualmente efetivos. Recomenda-se a utilização de óculos protetores na operação da lâmpada UV de 254nm.

3.17 Espectrofotômetro ou colorímetro

3.17.1 Recomenda-se que o comprimento de onda esteja na faixa do visível. Pode-se utilizar o Spectronic 20 (Thermo Spectronic) ou equivalente, com suporte para cubetas de 13mm x100mm.

CQ 3.17.2 Recomenda-se a calibração com padrão e branco do método, a cada uso do equipamento, antes da análise da amostra, que o padrão esteja na faixa desejada de absorbância e seja obtido de fonte externa.

4. Procedimentos laboratoriais

Embora os procedimentos de segurança não façam parte do programa de certificação do Laboratório, recomenda-se que o pessoal esteja ciente dos procedimentos de segurança gerais e específicos. É aconselhável que cada laboratório tenha um plano de segurança. Recomenda-se ainda que sejam obedecidas as orientações de segurança para produtos tóxicos e que sejam mantidas cópias das fichas de segurança fornecidas com esses produtos.

4.1 Procedimentos para esterilização

4.1.1 Os tempos requeridos para autoclavação de materiais a 121°C estão na tabela a seguir. Exceto para membranas filtrantes, discos absorventes e meios contendo carboidratos, esses tempos são os mínimos e podem ser ajustados, dependendo do volume, dos recipientes e da carga da autoclave. Meios à base de carboidratos não devem ser submetidos a tempos de esterilização excessivos.

Material	Tempo (minutos)
Membranas filtrantes e discos absorventes	10
Meios contendo carboidratos	12-15 ¹
Material contaminado	30 ²
Funis da técnica de MF	15
Frascos de coleta	15
Vidraria individual	15
Água de diluição	15
Água de enxágüe (0,5 a 1L)	15-30 ²

¹ Exceto quando especificado de outra forma pelo fabricante.

² O tempo depende do volume de água no recipiente e da carga da autoclave.

4.1.2 Membranas filtrantes, discos absorventes e todos os meios devem ser retirados da autoclave imediatamente após o término do ciclo.

4.1.3 Os porta-filtros devem ser autoclavados no início da primeira série de filtração. Uma série de filtração termina quando houver um tempo superior a trinta minutos entre a filtração de uma amostra e outra.

4.1.4 A luz ultravioleta de 254nm pode ser usada para desinfecção de equipamentos, se estes foram previamente esterilizados e se todos os outros materiais foram pré-esterilizados. A luz ultravioleta também pode ser utilizada para evitar a contaminação entre a filtração de diferentes amostras durante uma série de filtrações.

4.2 Frascos de coleta

CQ Recomenda-se que pelo menos um frasco de coleta seja selecionado ao acaso de cada lote de frascos esterilizados (ou outro tipo de recipiente, ou lote de frascos de coleta adquiridos) para confirmação de sua esterilidade. Essa confirmação é realizada adicionando-se cerca de 25mL de caldo não seletivo (p. ex., caldo triptona e soja, caldo tripticase e soja ou caldo triptona). O caldo inoculado deve ser incubado a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e verificado após 24 a 48 horas quanto à ocorrência de crescimento. Registrar os resultados e esterilizar todo o lote novamente caso seja detectado crescimento.

4.3 Água purificada

4.3.1 Somente água purificada de qualidade comprovada por meio de testes adequados, proveniente de destiladores ou deionizadores, pode ser utilizada para o preparo de meios, reagente e água de diluição ou enxágüe destinados a análises microbiológicas.

CQ 4.3.2 A qualidade da água purificada deve ser testada e atender aos seguintes critérios:

Parâmetro	Limites	Frequência
Condutividade	Resistividade $>0,5$ megaohms ou < 2 micromhos/cm (microsiemens/cm) a 25°C	Mensa ⁴
Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Zn	$<0,05$ mg/L por contaminante Em conjunto $< 0,1$ mg/L	Anual
Cloro residual total ¹	$<0,1$ mg/L	Mensal
Contagem de bactérias heterotróficas ²	$<500\text{UFC/mL}^5$	Mensal
Qualidade bacteriológica da água purificada ³	Razão de taxa de crescimento de 0,8 a 3,0	Anual

¹ O Método DPD deve ser usado. Não exigido para água bruta para captação Não-clorada.

² Método de inoculação em profundidade. "Standard Methods" Seção 9215B APHA - 1998.

³ "Standard Methods" (18ª ou 19ª ed). Seção 9020B, Suprimentos de Laboratório. Esse teste de qualidade bacteriológica não é requerido para água Tipo II ou de qualidade superior, conforme definido no "Standard Methods" (18ª ou 19ª ed - APHA 1992, APHA 1995.), Seção 1080C, ou para água qualidade meio ou superior, conforme definido no "Standard Methods" 20ª ed., APHA 1998 Seção 1080C. Se não for disponível água do Tipo II, qualidade

meio ou superior, e um destilador de vidro for utilizado para água purificada, pode ser utilizado o teste do dióxido de silício que atenda às especificações do “Standard Methods”, Seção 1080C (20ª ed.).

⁴ Mensalmente, se o aparelho fornece leitura contínua ou tem lâmpada piloto indicadora da resistividade; caso contrário, com cada novo lote de água purificada.

⁵ UFC = unidade formadora de colônias (mesmo que colônias, mas é um termo mais preciso).

4.4 Água de diluição e água de enxágüe

4.4.1 Recomenda-se que a solução tampão estoque ou água peptonada seja preparada conforme especificado no “Standard Methods”, Seção 9050C.

4.4.2 Recomenda-se que a solução tampão estoque seja autoclavada ou esterilizada por filtração. Rotular e datar os recipientes. Conservar a solução estoque na geladeira e certificar-se de que não apresenta turbidez.

CQ 4.4.3 Recomenda-se que cada lote de água de diluição ou enxágüe seja verificado quanto à esterilidade, pela adição de 50mL de água a 50mL de caldo duplo não-seletivo (p. ex., caldo triptona e soja, caldo tripticase e soja ou caldo triptose). Incubar a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e verificar o crescimento após 24 e 48 horas. Registrar os resultados e descartar o lote se for observado crescimento.

4.5 Lavagem de vidraria

4.5.1 Utilizar água destilada ou deionizada para o enxágüe final.

4.5.2 Lavar a vidraria com detergente apropriado para uso em laboratório.

CQ 4.5.3 Realizar o teste de resíduos inibidores (“Standard Methods” Seção 9020B, em Suprimentos de Laboratório) quando novo componente da lavagem, ou nova formulação de detergente, ou novo procedimento de lavagem for usado. Registrar os resultados. Esse teste assegura a ausência de resíduos tóxicos na vidraria.

CQ 4.5.4 Verificar cada lote de vidraria lavada, utilizada nas análises microbiológicas quanto ao pH, principalmente se tiver sido submetida a tratamentos ácidos ou alcalinos (“Standard Methods” Seção 9020B, em Suprimentos de Laboratório). Utilizar solução 0,04% de azul de bromotimol (ou solução indicadora de pH equivalente) e observar a coloração. A vidraria limpa, sem resíduos ácidos ou alcalinos vai apresentar reação neutra (coloração azul-esverdeada para o azul de bromotimol). Registrar os resultados. Esse teste assegura que a vidraria tem pH neutro.

5. Metodologia analítica

5.1 Instruções gerais

5.1.1 Nas análises realizadas para atendimento a padrões de qualidade deve ser utilizada somente a metodologia analítica especificada na “Total Coliform Rule” (40 CFR 141.21 (f)), na “Surface Water Treatment Rule” (SWTR) (40 CFR 141.74 (a)) e na “Ground Water Rule” (TBD).

5.1.2 O Laboratório deve estar certificado para todos os métodos analíticos utilizados para atender a padrões de qualidade. No mínimo, deve estar certificado para um método destinado à análise de coliformes totais, e um método para coliformes fecais ou *E.coli*. Recomenda-se também que o Laboratório esteja certificado para um segundo método relativo a coliformes totais se o primeiro

não puder ser utilizado para algum tipo de água de consumo humano (p. ex., se a água usualmente produz crescimento confluyente). Além disso, os laboratórios que podem realizar contagem de bactérias heterotróficas para atendimento à SWTR devem estar certificados pelo método de inoculação em profundidade ou pelo SimPlate.

5.1.3 As amostras de água devem ser agitadas vigorosamente pelo menos 25 vezes antes da análise.

CQ 5.1.4 Verificar a exatidão do volume da água em pelo menos um frasco de cada lote. Para volumes de 90 ou de 99mL, a tolerância recomendada é de $\pm 2\text{mL}$.

5.1.5 Deve ser analisado um volume de 100mL de água de consumo humano para coliformes totais. A fim de assegurar a exatidão num mesmo método e entre os vários métodos utilizados, é importante que o Laboratório meça com precisão o volume de amostra a ser analisado. Para assegurar a análise do volume requerido de 100mL, qualquer que seja o método aprovado que o Laboratório esteja utilizando, as boas práticas de laboratório determinam o uso de um recipiente de medida estéril e calibrado para medir esse volume. Não se recomenda que uma porção da amostra seja descartada para atingir o volume necessário. Esse procedimento facilmente resultaria num erro laboratorial que exigiria o cancelamento da amostra.

5.1.6 Meios (ou substratos definidos)

5.1.6.1 Recomenda-se a utilização de meios desidratados ou preparados disponíveis, no comércio uma vez que o controle de qualidade é mais rigoroso nesses casos. Armazenar os meios desidratados em local fresco e seco, e descartar na data de validade indicada pelo fabricante. Descartar meios com aspectos alterado.

CQ 5.1.6.2 Para meios preparados no laboratório, registrar a data de preparação, tipo de meio, número de lote, tempo e temperatura de esterilização, pH final (após a esterilização) e as iniciais do técnico.

CQ 5.1.6.3 Para meios adquiridos prontos, registrar a data do recebimento, tipo de meio, número do lote, e verificação do pH de cada lote (caso indicado pelo fabricante ou método). Descartar na data de vencimento indicada pelo fabricante.

CQ 5.1.6.4 Recomenda-se que cada novo lote de meio (adquirido pronto, desidratado ou preparado pelo Laboratório) seja verificado antes do uso, quanto à esterilidade, e testado com culturas controle positivas e negativas. Aos laboratórios que utilizam meios prontos com validade superior a 90 dias, recomenda-se, adicionalmente, realizar os testes com culturas controle quatro vezes ao ano. Aconselha-se que os laboratórios façam tais testes com maior frequência. Podem ser mantidos estoques das culturas controle (coliformes totais, fecais e *E. coli*), testados quanto à pureza periodicamente ou podem ser utilizados discos (disponíveis comercialmente) impregnados com os organismos. Registrar os resultados. A tabela a seguir relaciona culturas controle positivas e negativas que os laboratórios podem adotar para esses testes, embora outras culturas controle também sejam aceitáveis.

Armazenar os meios desidratados em local fresco

Culturas controle para testes microbiológicos

Grupo	Cultura controle positiva ⁹	Cultura controle negativa ⁹
Coliformes totais	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ¹ <i>Proteus vulgaris</i> ² <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹
Coliformes fecais	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (termotolerante)	<i>Enterobacter aerogenes</i> ³
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (linhagem MUG positiva)	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ⁴ (termotolerante)
Enterococos ⁵	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ⁶ <i>E. coli</i> ⁷ <i>Serratia marcescens</i> ⁸

¹ *S. aureus*, *P. aeruginosa* – não fermentadores da lactose.

² *P. vulgaris* – não fermentador da lactose; utiliza lactose hidrolisada, indicando superaquecimento do meio

³ *E. aerogenes* – fermenta a lactose, mas não é tipicamente termotolerante.

⁴ *K. pneumoniae*-fermenta a lactose mas não hidrolisa o MUG.

⁵ Não utilizar linhagens relacionadas ao gênero *Streptococcus* como controle positivo.

⁶ *S. aureus*-sensível ao ácido nalidíxico do meio.

⁷ *E. coli*-sensível à azida sódica do meio.

⁸ *S. marcescens*-não irá hidrolisar composto fluorogênico do meio.

⁹ Exemplos de linhagens ATCC apropriadas:

Enterococcus faecalis ATCC 11700

Enterococcus faecium ATCC 6057

Enterobacter aerogenes ATCC 13048

Escherichia coli ATCC 8739 ou 25922

Klebsiella pneumoniae (termotolerante) ATCC 13883

Proteus vulgaris ATCC 13315

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Serratia marcescens ATCC 14756

Staphylococcus aureus ATCC 6538

5.1.6.5 Manter ao abrigo da luz os meios preparados armazenados após a esterilização, evitando a perda de umidade, nos tempos especificados na tabela a seguir. As placas podem ser colocadas em sacos ou caixas plásticas. Tanto para os caldos como para os meios sólidos, indicar na caixa, ou saco plástico, a data de preparação ou a data de validade. Se o meio for mantido na geladeira, recomenda-se que atinja a temperatura ambiente antes do uso; descartar tubos ou placas que apresentarem crescimento, bolhas de ar ou ambos. Descartar meios líquidos se apresentarem perda por evaporação de mais de 10% do volume original.

Tempo e temperaturas máximas de conservação para meios de cultura preparados

Meio	Temperatura máxima	Tempo máximo
Placas com ágar	1º-5ºC	2 semanas
Caldos em tubos ou frascos com tampas frouxas	1º-30ºC	2 semanas
Caldos em tubos ou frascos com tampas herméticas	1º-30ºC	3 meses

CQ 5.1.7 Os laboratórios são aconselhados a realizar testes comparativos entre métodos recentemente aprovados e aqueles aprovados pela EPA para a contagem de coliformes totais, durante vários meses ou estações, de forma a comprovar a eficácia do novo método frente à grande variedade de tipos de amostras de água submetidas à análise. Durante esses testes pode ser necessária a contaminação de algumas amostras com esgoto ou culturas puras para obtenção de resultados positivos.

5.1.8 Uma lista de métodos analíticos aprovados (ou propostos, conforme assinalado), legislação aplicável e item deste Manual no qual o método é mencionado encontra-se na tabela abaixo:

Métodos Aprovados	Item	Meios	Referência ¹	TCR ² Detecção	SWTR ² Contagem	GWR ² Detecção
COLIFORMES TOTAIS						
Fermentação em meios líquidos	5.2.2	CLT → CLVBB	SM 9221B,C	X	X	
	5.2.3	Caldo P-A → CLVBB	SM 9221D	X		
Substrato enzimático	5.3.2	Colilert®, Colilert 18®	SM 9223	X	X	
	5.3.2	Colisure®	SM 9223	X		
	5.3.2	Readycult® ou Fluorocult LMX®		X		
	5.3.2	E* Colite®		X		
	5.3.2	Colitag®		X		
Filtração em membrana	5.4.2	M-Endo ou M-Endo LES → CLT, CLVBB	SM 9222B,C	X	X	
	5.4.2	Meio MI	SM 9222	X	X	
	5.4.2	M-ColiBlue 24®		X		
	5.4.2	Chromocult®		X		

Métodos Aprovados	Item	Meios	Referência ¹	TCR ² Detecção	SWTR ² Contagem	GWR ² Detecção
	5.4.2	Coliscan®		X		
COLIFORMES FECAIS						
Fermentação em meios líquidos	5.2.4	CLT ou caldo P/A → caldo EC	SM 9221B,D	X	X	
	5.2.4	Caldo A-1	SM 9221E		X	
Filtração em membrana	5.2.4	Meio M-Endo → caldo EC	SM 9222B			
	5.4.2	mFC	SM 9222D		X	
<i>Escherichia coli</i>						
Substrato enzimático	5.3.2	Colilert®, Colilert 18®	SM 9223	X		X
	5.3.2	Colisure®	SM 9223	X		X
	5.3.2	E* Colite®		X		X
	5.3.2	Readycult® ou Fluorocult LMX®		X		
	5.3.3	CLT, caldo P-A, M-Endo → EC-MUG	SM 9221 B,D; SM 9222B; SM 9221F	X		X
	5.3.2	Colitag®		X		
Membrana filtrante	5.4.2	Meio MI	SM9222	X		X
	5.4.2	mColiBlue24®		X		X
	5.4.2	Chromocult®		X		
	5.4.2	Coliscan®		X		
	5.4.3	M-Endo ou Endo LES → AN MUG	SM 9222B SM 9222G	X		X
ENTEROCOCOS³						
Substrato enzimático	5.3.4	Enterolert	ASTM D6503-99			X
Fermentação em meio líquido	5.2.5	Dextrose Azida → BEA/BHI	SM 9230B			X
Filtração em membrana	5.4.4	ME → EIA m-Enterococcus	SM 9230C			X
	5.4.4	mEI	EPA 1600			

Métodos Aprovados	Item	Meios	Referência ¹	TCR ² Detecção	SWTR ² Contagem	GWR ² Detecção
	5.4.2	Coliscan®		X		
BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS						
Inoculação em profundidade	5.5	“Plate count agar”	SM 9215B		X	
Substrato multienzimático	5.5	SimPlate®				
Inoculação em profundidade, em superfície ou filtração em membrana	5.5	R2A		X ⁴		
COLIFAGOS SOMÁTICOS E F-ESPECÍFICOS⁴						
Método de plaqueamento	5.6.2	Enriquecimento em 2 etapas	EPA 1601			X
	5.6.3	Camada simples	EPA 1602			X

¹SM = Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18^{ta}, 19^{ta} ou 20^{ta} edição, - APHA 1992, 1995, 1998.

²TCR = Total Coliform Rule (40 CFR 141.21 (f), SWTR = Surface Water Treatment Rule (40 CFR 141.74 (a)). Os métodos analíticos aprovados pelo TCR e SWTR estão apresentados no Anexo

³GWR = Baseado na GWR proposta (65 FR 30194, 10/5/2000). Até que a GWR seja promulgada, os laboratórios não serão certificados para os métodos para enterococos e colifagos.

⁴Para possível uso se o sistema operar conforme uma variação da TCR.

5.2 Métodos baseados na fermentação em meios líquidos

5.2.1 Instruções gerais

5.2.1.1 Recomenda-se que o nível de água no banho-maria esteja acima do nível superior de meio de cultura nos tubos.

5.2.1.2 Um banho seco é aceitável se a temperatura especificada puder ser mantida para todos os locais de incubação dos tubos.

5.2.2 Técnica de fermentação em tubos múltiplos (para detecção de coliformes totais em águas de consumo humano e contagem de coliformes totais em águas brutas para captação).

5.2.2.1 Para amostras de águas de consumo humano: Várias configurações de teste podem ser usadas (CFR 141.21 (f) (3), ver Anexo), desde que um volume total de 100mL de amostra seja analisado.

5.2.2.2 Para amostras de águas brutas para captação: Os laboratórios devem usar pelo menos três séries de cinco tubos cada, com diluições apropriadas da amostra de água bruta.

5.2.2.3 Meios

5.2.2.3.1 Deve ser usado caldo lauril triptose (CLT) (também conhecido como caldo lauril sulfato) no teste presuntivo e o caldo lactosado verde brilhante e bile 2% (CLVBB) no teste confirmativo. O caldo lactosado (CL) pode ser usado no lugar do CLT (40 CFR 141.21 (f) (3)), se o Laboratório tiver realizado pelo menos 25 testes em paralelo com esse meio e o CLT, utilizando as águas normalmente analisadas em rotina, e se essa comparação demonstrar que a taxa de falso-positivos e falso-negativos para coliformes totais, usando CL, é menor que 10%. Essa comparação deve ser documentada. O pH final deve ser 6,8±0,2 para o CLT e 7,2±0,2 para o CLVBB 2%.

5.2.2.3.2 A concentração do meio deve ser ajustada para compensar o volume de amostra, de forma que o meio resultante, após adição da amostra, tenha concentração simples. Opcionalmente, se um volume único de amostra de 100mL é utilizado, recomenda-se que o tubo invertido seja substituído por um indicador ácido-base (púrpura de bromocresol) para prevenir problemas associados com bolhas de gás em grandes tubos invertidos. O meio deve ser autoclavado a 121°C durante 12-15 minutos.

5.2.2.3.3 O meio esterilizado nos tubos deve ser examinado quanto à presença de bolhas nos tubos invertidos e para verificar se pelo menos metade a dois terços desses tubos são cobertos após a adição da amostra.

5.2.2.4 Após a inoculação do meio, ele deve ser incubado a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Se não for detectado gás ou acidez, deve haver nova incubação por 24 horas (tempo de incubação total 48 ± 3 horas).

5.2.2.5 Cada tubo com crescimento e positivo para gás ou ácido em 24 ou 48 horas deve ser confirmado em CLVBB 2%. O teste completo não é exigido.

5.2.2.6 Para amostras de águas de consumo humano: Testar cada amostra positiva para coliformes totais quanto à presença de coliformes fecais ou *E.coli*.

5.2.2.7 Cancelamento de amostras negativas para coliformes totais

5.2.2.7.1 Para amostras de águas de consumo humano: Todas as amostras que resultem em uma cultura turva (ou seja, crescimento abundante) na ausência de produção de ácido ou gás, em CLT ou CL, devem ser canceladas. O Laboratório deve coletar ou requerer que o sistema colete, em 24 horas, outra amostra do mesmo local da amostra cancelada. (Antes do cancelamento, o Laboratório pode realizar um teste confirmativo, ou um teste para coliformes fecais ou para *E. coli*, ou ambos, na cultura negativa para coliformes totais, para confirmar a inibição. Se o teste confirmativo for positivo para coliformes, ou se forem detectados, coliformes fecais ou *E.coli*, a amostra deve ser relatada como tal. Com um resultado positivo para coliformes fecais ou *E.coli* a amostra é considerada positiva para coliformes totais, fecais e *E.coli* mesmo que o teste presuntivo tenha sido negativo para coliformes totais. Se esse teste de confirmação for negativo, a amostra deve ser cancelada, porque níveis elevados de bactérias não-coliformes nos tubos presuntivos podem ter alterado ou inibido o crescimento dos coliformes na amostra).

5.2.2.7.2 Para amostras de águas brutas para captação: todas as amostras que resultarem em uma cultura turva (ou seja, crescimento abundante), sem produção de ácido ou gás, em CLT ou CL, devem ser canceladas. Recomenda-se que o laboratório colete, ou requirite que o sistema colete outra amostra do mesmo local da amostra original cancelada. (Antes do cancelamento o laboratório pode realizar um teste confirmativo na cultura negativa para coliformes totais. Se o teste confirmativo for positivo, o NMP deve ser relatado. Se o teste for negativo para coliformes totais, a amostra deve ser cancelada.)

5.2.3 Teste Presença-Ausência (P-A) para detecção de coliformes totais em águas para consumo humano

5.2.3.1 Meios

5.2.3.1.1 Uma formulação seis vezes concentrada pode ser utilizada. Se essa formulação for utilizada, ela deve ser esterilizada por filtração em vez de autoclavação.

5.2.3.1.2 O meio deve ser autoclavado por 12 minutos a 121°C. Recomenda-se que o tempo total na autoclave seja menor que 30 minutos. Deve ser deixado espaço entre os frascos. O pH final deve ser $6,8 \pm 0,2$.

5.2.3.1.3 Na armazenagem do meio preparado recomenda-se manter o frasco de cultura a 1°-30°C, ao abrigo da luz, por no máximo três meses. Se a evaporação exceder 10% do volume original, o meio deve ser descartado.

5.2.3.2 Um volume de amostra de 100mL deve ser inoculado no frasco de cultura P-A.

5.2.3.3 O meio deve ser incubado a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e observado quanto à coloração amarela (acidez) após 24 e 48 horas.

5.2.3.4 Culturas de coloração amarela devem ser confirmadas em CLVBB 2% e deve ser realizado um teste para coliformes fecais ou *E.coli*.

5.2.3.5 Todas as amostras que resultam em uma cultura turva, sem coloração amarela, no frasco de cultura P-A devem ser canceladas. O Laboratório deve coletar, ou requerer que o sistema colete outra amostra do mesmo local que a amostra original cancelada. (Antes do cancelamento, o Laboratório pode realizar um teste confirmativo, ou um teste para coliformes fecais ou para *E. coli*, ou ambos. Se o teste confirmativo for positivo para coliformes ou se os coliformes fecais ou a *E.coli* forem detectados, a amostra deve ser relatada como tal. Se esse teste confirmativo for negativo, a amostra deve ser cancelada. Com um resultado positivo para coliformes fecais ou *E.coli* a amostra é considerada positiva para coliformes totais, fecais e *E.coli*, mesmo que o teste presuntivo tenha sido negativo para coliformes totais.)

5.2.4 Teste para coliformes fecais (utilizando meio EC para coliformes fecais em águas de consumo humano ou águas brutas para captação, ou meio A1 para coliformes fecais em águas brutas para captação somente)

5.2.4.1 Meio EC

5.2.4.1.1 Utilizar o meio EC para testar a presença de coliformes fecais em uma cultura positiva para coliformes totais, segundo a “Total Coliform Rule”. O Laboratório deve transferir cada cultura positiva para coliformes totais de um frasco ou tubo, ou cada colônia presuntiva para coliformes totais, a não ser que esteja sendo utilizado um “swab” de algodão para um tubo de meio EC contendo um tubo invertido, como especificado no § 141.21 (f) (5). (Anexo).

5.2.4.1.2 O meio EC pode ser usado na contagem de Coliformes fecais em águas brutas para captação, de acordo com a “SurfaceWater Treatment Rule”. Inicialmente, realizar o teste de

fermentação em tubos múltiplos (fase presuntiva). Utilizar três volumes de amostra de águas brutas para captação (ex., 10, 1 e 0,1mL) em cinco ou dez tubos por volume de amostra. Transferir cada cultura dos tubos positivos para coliformes totais para um tubo contendo o meio EC com um tubo invertido.

5.2.4.1.3 Autoclavar o meio EC por 12-15 minutos a 121°C. O pH final deve ser 6,9±0,2.

5.2.4.1.4 Verificar a presença de bolhas de ar nos tubos invertidos. Após a adição da amostra, os tubos invertidos devem ficar com metade a dois terços de sua altura cobertos pelo meio de cultura.

5.2.4.1.5 O meio EC deve ser incubado a 44,5°±0,2°C por 24±2 horas.

5.2.4.1.6 A presença de gás no tubo invertido numa cultura turva deve ser considerada resposta positiva para coliformes fecais, qualquer que seja o resultado de outro teste subsequente naquela cultura.

5.2.4.2 Meio A1

5.2.4.2.1 O meio A1 pode ser usado em alternativa ao meio EC para a quantificação de coliformes fecais em águas brutas para captação, segundo a “Surface Water Treatment Rule”. O meio A1 não deve ser usado para amostras de águas para consumo humano. Utilizar três volumes da água bruta (ex. 10, 1 e 0,1mL) em cinco ou dez tubos por volume de amostra. Ao contrário do meio EC, o meio A1 pode ser usado para o isolamento direto de coliformes fecais da água.

5.2.4.2.2 O meio A1 deve ser esterilizado por autoclavação a 121°C por dez minutos. O pH final deve ser 6,9±0,1.

5.2.4.2.3 Os tubos invertidos devem ser examinados para verificar a presença de bolhas de ar.

5.2.4.2.4 O meio A1 deve ser incubado a 35°±0,5°C por três horas, e em seguida a 44,5°±0,2°C por 21±2 horas.

5.2.4.2.5 Recomenda-se que todos de tampas frouxas sejam mantidos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por duas semanas no máximo. Em tubos de tampa de rosca, meio A1 deve ser mantido no máximo por três meses, ao abrigo da luz na temperatura de 4° C.*

**Nota: : Observar que o período de manutenção recomendado pelo “ Standard Methods” 20ª ed. (APHA 1998) é de uma semana.*

5.2.4.3 A presença de gás no tubo invertido em uma cultura turva deve ser considerada resultado positivo para coliformes fecais, independentemente do resultado de qualquer outro teste subsequente naquela cultura.

5.2.5 Meio dextrose azida (para detecção de estreptococos fecais em águas subterrâneas)

5.2.5.1 Para testar 100mL de amostra, preparar o meio em concentração tripla (3X) em frasco para cultura e autoclavar a 121°C por 15 minutos. O pH final deve ser $7,2 \pm 0,2$.

5.2.5.2 Adicionar um volume de 100mL de amostra de água ao meio esterilizado e incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5.2.5.3 Examinar a cultura quanto à presença de turbidez após 24 ± 2 horas. Se não for observada turbidez, incubar novamente e verificar após um tempo total de incubação de 48 ± 3 horas.

5.2.5.4 Uma cultura turva pode ser confirmada estriando-se uma porção do caldo em ágar bile esculina (ABE) ou em ágar azida bile esculina (AABE). (O meio de confirmação mencionado no “Standard Methods” não é mais disponível comercialmente).

5.2.5.5 O ABE ou o AABE devem ser esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos. O pH final deve ser $6,6 \pm 0,2$ para o ABE e $7,1 \pm 0,2$ para o AABE.

5.2.5.6 Após a inoculação, as placas de ABE e AABE devem ser incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

5.2.5.7 Colônias castanho-enegrecidas no ABE ou no AABE, com halos marrons, confirmam a presença de estreptococos fecais. Se necessário, o teste para enterococos pode ser realizado em uma ou mais colônias positivas para estreptococos fecais, transferindo-se as mesmas para caldo infusão de cérebro e coração, suplementado com 6,5% de NaCl, e incubando-se a cultura a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 48 horas. A ocorrência de crescimento indica a presença de enterococos.

5.3 Testes com substratos enzimáticos (cromogênicos e fluorogênicos)

5.3.1 Instruções Gerais

5.3.1.1 Para detecção de coliformes totais e *E.coli* em amostras de águas para consumo humano, o laboratório pode usar o teste MMO-MUG (Colilert), o teste Colisure, o teste E*Colite, o teste Presença-Ausência Readycult Coliforms 100 (ou teste Caldo Fluorocult LMX) ou o teste Colitag. Esses testes são disponíveis em várias configurações. Para contagem de coliformes totais em águas

brutas para captação, o laboratório pode usar o teste Colilert. Se o laboratório utiliza um método baseado na fermentação para detectar coliformes totais em águas de consumo humano, e a amostra for positiva, a cultura pode ser transferida para EC-MUG para detectar *E.coli*, e mais nenhum outro ensaio enzimático mencionado nesse item.

5.3.1.2 Meios

5.3.1.2.1 Os meios não devem ser preparados a partir de seus componentes básicos, mas sim adquiridos prontos para uso.

5.3.1.2.2 Os meios devem ser protegidos da luz.

5.3.1.2.3 Alguns lotes de meios com substrato enzimático apresentam fluorescência. Portanto, cada lote de meio deve ser verificado antes do uso com lâmpada ultravioleta de 365-366nm com bulbo de 6 watts. Para verificar os meios Colilert, Colilert-18, Colisure, Readycult/Fluorocult LMX e Colitag, um sachê do meio deve ser dissolvido com água estéril em um recipiente não-fluorescente. Se o meio apresentar fluorescência fraca, o laboratório deverá utilizar outro que não apresente essa característica.

5.3.1.2.4 Se após adição das amostras for observada uma coloração inadequada antes da incubação, recomenda-se que o meio seja descartado e que outro lote seja utilizado. Recomenda-se igualmente que o fornecedor seja notificado e que novas amostras sejam coletadas. Antes da incubação, os meios Colilert, Colilert 18 e Colitag são praticamente incolores ou apresentam uma coloração muito ligeira, enquanto que o Colisure e o E*Colite são amarelos e o Readycult/Fluorocult é levemente amarelado.

5.3.1.3 Recomenda-se que os tubos e frascos de plástico e vidro sejam testados antes do uso com uma lâmpada ultravioleta de 365-366nm, com bulbo de 6 watts, para verificar se eles não fluorescem. Caso isso ocorra, utilizar outro tipo de recipiente.

5.3.1.4 Se o saco Whirl-Pak® for utilizado para incubar o Colilert ou o Colitag ou qualquer outro meio cuja coloração se altera para o amarelo no caso de resultado positivo, utilizar o tipo que tem uma barreira (por ex. BO1417) de forma a impedir emissões gasosas para outros sacos Whirl-Pak® durante a incubação.

CQ 5.3.1.5 As incubadoras, principalmente as pequenas de potência baixa e jaqueta de ar, podem levar várias horas para aquecer uma amostra de 100mL de água fria até a temperatura desejada. Esse problema pode causar resultados falso-negativos com os testes enzimáticos, e possivelmente com outros testes também. Portanto, os laboratórios que possuem esse tipo de incubadora devem seguir as seguintes instruções na realização de testes com substratos cromogênicos e fluorogênicos:

Teste	Instruções para pré-incubação da amostra ^{1,2}
Colilert (Presença/Ausência)	O período especificado de 24 horas de incubação inclui o tempo necessário para que a amostra atinja 35°C ¹
Colilert Quanti-Tray	O período especificado de 24 horas de incubação inclui o tempo necessário para que a amostra atinja 35°C
Colilert-18 (Presença/Ausência)	Pré-aquecer a amostra em banho-maria a 35°C por 20 minutos ou a 44,5°C por 7 a 10 minutos
Colilert-18 Quanti-Tray	Deixar a amostra atingir a temperatura ambiente (20°-30°C) antes de iniciar o tempo de incubação de 18 horas
Colisure	Deixar a amostra atingir a temperatura ambiente (20°-30°C) antes de iniciar o tempo de incubação de 24 horas
Teste Presença/Ausência Readycult Coliforms 100 e Caldo Fluorocult LMX	O período especificado de 24 horas de incubação inclui o tempo necessário para que a amostra atinja 35°±0,5°C
Colitag	O período especificado de 24 horas de incubação inclui o tempo necessário para que a amostra atinja 35°±0,5°C

¹Se o laboratório colocar uma grande carga numa incubadora pequena, as amostras devem atingir a temperatura ambiente antes da incubação.

²Informação baseada nas instruções do fabricante.

5.3.1.6 Se um banho-maria for utilizado, o nível da água deve estar acima do nível superior do meio de cultura.

5.3.1.7 Para o teste da *E.coli* o laboratório deve colocar todas as amostras positivas para coliformes totais sob a lâmpada ultravioleta (365-366nm, 6 watts) em local escuro. Se a *E.coli* estiver presente o meio irá emitir uma fluorescência azul.

5.3.1.8 Os testes com substrato enzimático não podem ser utilizados para confirmar culturas presuntivas positivas para coliformes totais em caldos baseados em fermentação de açúcares (ex., testes com CLT, CL, ou teste P-A) ou em membranas filtrantes. A elevada densidade de bactérias não-coliformes ou a turbidez do inóculo podem inibir os coliformes ou sobrecarregar o reagente inibidor do teste com substrato enzimático e causar resultados falso-positivos.

5.3.1.9 Cancelar qualquer amostra que produza uma coloração atípica (ex., negro ou negro-esverdeado) na ausência de coloração amarela. O Laboratório deve coletar ou requerer que o sistema colete outra amostra do mesmo local da amostra original cancelada. O Laboratório deve usar outro método para testar a segunda amostra. De acordo com o fabricante do Colilert, águas com altos teores de ferro ou manganês na presença de sulfito de hidrogênio podem causar coloração negra ou negro-esverdeada. Essa coloração não ocorre com o Readycult, Colisure ou Colitag, segundo seus fabricantes.

5.3.1.10 Os comparadores de coloração fornecidos pelos fabricantes devem ser descartados na data de validade.

5.3.2 Critérios para meios específicos

5.3.2.1 Para o teste Colilert as amostras devem ser incubadas 24 horas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Uma coloração amarela no meio, igual ou superior à coloração do comparador indica que a amostra é positiva para coliformes totais. Se a amostra estiver amarela, porém mais clara que o comparador, ela deve ser incubada por 4 horas adicionais (não incubar mais de 28 horas no total). Se a cor ainda permanecer mais clara que a do comparador após 28 horas, a amostra deve ser considerada negativa. Uma amostra positiva para coliformes, que fluoresce sob luz UV, indica a presença de *E.coli*. Os laboratórios que usam o teste Colilert-18 devem incubar a amostra por 18 horas (até 22 horas se a amostra após 18 horas apresentar coloração amarela mais clara que a do comparador).

5.3.2.1.1 Para a quantificação de coliformes totais em águas brutas para captação com o teste Colilert, configurações de cinco ou dez tubos, Quanti-Tray, ou Quanti-Tray 2000, podem ser usadas para cada diluição da amostra a ser testada. O diluente utilizado pode ser água deionizada ou destilada estéril, mas não água tamponada.

CQ 5.3.2.1.2 Se o Quanti-Tray ou o Quanti-Tray 2000 for utilizado, a seladora deve ser verificada mensalmente adicionando-se um corante (por ex. púrpura de bromocresol) à água. Se o corante for observado fora dos pocinhos, realizar manutenção ou utilizar outra seladora.

5.3.2.2 Para o teste Colisure as amostras devem ser incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Se a verificação dos resultados após 24 horas não for conveniente, ela pode ser realizada em qualquer tempo até 48 horas. Se o meio mudar de cor de amarelo para vermelho ou magenta, a amostra é positiva para coliformes totais. Uma amostra positiva para coliformes que apresenta fluorescência sob luz UV é positiva para *E.coli*.

5.3.2.3 Para o teste E*Colite, as amostras devem ser incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 28 horas. Se os coliformes totais estiverem presentes, o meio muda de amarelo para azul ou azul-esverdeado, ou se observa uma cor azul nos cantos do saco. Se a *E.coli* estiver presente, o meio fluoresce sob luz UV. Se não for observada fluorescência, incubar por um período adicional de 20 horas (até um tempo total de incubação de 48 horas) e verificar a fluorescência novamente. Se o meio se tornar

vermelho, deve-se supor que uma falha na vedação permitiu o vazamento do bactericida (no terceiro compartimento do saco) para o compartimento de meio. Nesse caso, descartar o teste e requisitar a coleta de outra amostra.

5.3.2.4 Para o teste Presença-Ausência Readycult Coliforms 100, adicionar o conteúdo do sachê a 100mL da amostra, seguindo-se uma incubação a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 1 hora. Se os coliformes estiverem presentes o meio muda de cor de ligeiramente amarelo para azul-esverdeado. Além disso, se *E.coli* estiver presente, o meio sob luz UV longa (365-366nm) emite uma fluorescência azul clara brilhante. Se for necessária a confirmação de *E.coli*, adicionar o reativo indol de Kovacs ao caldo; a formação imediata de um anel vermelho confirma a presença de *E.coli*.

5.3.2.5 O caldo Fluorocult LMX é idêntico ao Readycult, porém é fornecido desidratado, na forma de granulado em frasco plástico de 500g. Para o teste, adicionar 34g do Fluorocult LMX a 1 L de água purificada e ferver até a dissolução completa. Transferir alíquotas de 100mL a frascos de 250mL e autoclavar por 15 minutos a 121°C . Esfriar até a temperatura ambiente, adicionar 100mL da amostra de água e incubar. Não adicionar o suplemento *E.coli*/Coliforme ao meio.

5.3.2.6 Para o teste Colitag, as amostras devem ser incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Durante a incubação, a trimetilamina-N-óxido no meio Colitag faz com que o pH do meio aumente de 6,2 para 6,8-7,2. A cor amarela no meio indica a presença de coliformes totais. A fluorescência de coliformes totais sob luz UV indica a presença de *E.coli*.

5.3.3 Teste com o meio EC + MUG para a detecção de *E.coli*

5.3.3.1 Quando se usa EC+MUG uma cultura positiva para coliformes totais deve ser transferida de um tubo ou colônia presuntiva para o meio EC+MUG, conforme especificado no § 141.21 (f)(5) (Ver Anexo).

5.3.3.2 O MUG pode ser adicionado ao meio EC antes da autoclavação. O meio EC+MUG também pode ser obtido comercialmente. A concentração final de MUG deve ser $50\mu\text{g/mL}$, e o pH final $6,9\pm 0,2$.

5.3.3.3 O tubo invertido pode ser omitido porque a produção de gás não é relevante para a detecção de *E.coli*.

5.3.3.4 O meio deve ser incubado a $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas e testado quanto à produção de fluorescência.

5.3.4 Teste Enterolert (para detecção de enterococos em águas subterrâneas)

5.3.4.1 O meio deve ser mantido ao abrigo da luz, na temperatura de 4°-30°C até o uso.

5.3.4.2 Adicionar o reativo Enterolert a 100mL da amostra de água, e incubar a 41°±0,5°C por 24 a 28 horas. A produção de fluorescência sob a lâmpada UV indica a presença de enterococos.

5.3.4.3 A ocorrência de fluorescência após 28 horas não pode ser considerada como resposta positiva para a presença de enterococos.

5.4. Métodos baseados na técnica de membrana filtrante (MF)

5.4.1 Instruções gerais

5.4.1.1 Águas brutas para captação (SWTR): para otimizar a contagem, devem ser utilizadas diluições apropriadas da amostra que resultem em 20 a 80 colônias de coliformes totais e 20 a 60 colônias de coliformes fecais para pelo menos um volume ou diluição da amostra.

CQ 5.4.1.2 Recomenda-se testar a esterilidade de cada porta-filtro e membrana no começo e no final da série de filtração, pela filtração de 20-30mL de água de diluição e verificação de crescimento. Se esse controle indicar contaminação, todos os dados das amostras filtradas nessa série devem ser rejeitados e requisitada nova amostra. A série de filtração termina quando decorrem 30 minutos ou mais entre uma filtração e outra.

5.4.1.3 Após a filtração de cada amostra, o porta-filtro deve ser enxaguado com duas ou três porções de 20-30mL de água de enxágüe estéril, para assegurar que toda a amostra foi enxaguada antes da remoção da membrana. Após a remoção da membrana, o porta-filtro pode ser enxaguado novamente com duas ou três porções de água de enxágüe estéril ou exposto à luz UV de 254nm de comprimento de onda, durante, pelo menos, 2 minutos para impedir a contaminação entre as amostras, principalmente para águas superficiais.

5.4.1.4 Discos absorventes devem ser saturados com meios líquidos (pelo menos 2mL de caldo) e o excesso de meio deve ser removido decantando-se a placa.

5.4.2 Método de MF para detecção de coliformes totais e *E.coli* em águas de consumo humano, contagem de coliformes totais ou fecais em águas brutas para captação, e detecção de *E.coli* em águas subterrâneas

5.4.2.1 Meios para coliformes totais, fecais e *E.coli*

5.4.2.1.1 Ágar ou caldo M-Endo (também conhecido como caldo M-Endo MF e Caldo M-Coliformes) ou ágar Endo LES (também conhecido como ágar M-Endo LES) para detecção de coliformes totais em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação. Esses meios podem ser usados na técnica de etapa única ou com enriquecimento. É necessário assegurar que o etanol utilizado na reconstituição do meio não está hidratado. Aconselha-se que o meio seja preparado em frasco estéril e aquecido até próximo ao ponto de ebulição em banho-maria fervente, ou placa aquecedora com agitação (sob supervisão constante). O meio não deve ferver. O pH final é $7,2 \pm 0,2$ para o M-Endo ágar LES e $7,2 \pm 0,1$ para o meio M-Endo.

5.4.2.1.2 Meio mColiBlue24 para detecção de coliformes totais e *E.coli* em águas de consumo humano. Recomenda-se que as ampolas de caldo sejam invertidas duas a três vezes para misturar o conteúdo antes da abertura. Em seguida, verter o líquido homogeneamente sobre o disco absorvente. Recomenda-se que ampolas fechadas sejam mantidas na geladeira, ao abrigo da luz, até a data de validade. Descartar antes, se for observado crescimento. O pH final do meio é $7,0 \pm 0,2$.

5.4.2.1.3 Meio MI (com ou sem ágar) para detecção de coliformes totais e *E.coli* em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação. Não autoclavar ágar ou caldo MI adquirido pronto, pré-esterilizado, em frascos. Fundir o ágar em banho-maria fervente (ou por outro processo recomendado pelo fabricante). Assim que o meio estiver completamente fundido, esfriar ligeiramente e verter em placas estéreis. Recomenda-se cautela para evitar um superaquecimento do ágar, pois o calor excessivo destrói a eficácia do antibiótico cefsulodina. Se for utilizado o meio desidratado, seguir as instruções do fabricante para o preparo e autoclavação do meio. Resfriar o ágar, adicionar a solução do antibiótico cefsulodina recentemente preparada e esterilizada por filtração, e verter em placas estéreis. O pH final desse ágar é $6,95 \pm 0,20$, e do caldo $7,05 \pm 0,20$. A preparação e uso do ágar e caldo MI estão descritos no artigo New medium for the simultaneous detection of total coliform and *Escherichia coli* in water” Brenner K.P. et al., 1993 (**Applied and Environmental Microbiology** 59:3534-3544) e no “EPA Method 1604”, que está disponível em www.epa.gov/microbes

5.4.2.1.4 Ágar Chromocult Coliform para detecção de coliformes totais e *E.coli* em águas de consumo humano. Não autoclavar ou aquecer excessivamente. O pH final é $6,8 \pm 0,2$. Se for esperado um crescimento abundante de bactérias heterotróficas (principalmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas* spp), adicionar solução de cefsulodina (10mg em 2mL de água deionizada ou destilada) a 1L de meio fundido e resfriado (45° - 50° C). Verificar com o fabricante, “EMD Chemicals Inc.” em www.emdchemicals.com. informações sobre o desempenho desse meio com vários tipos de filtros.

5.4.2.1.5 Coliscan® para detecção de coliformes totais e *E.coli* em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação. O Coliscan pode ser encontrado na forma de pó ou como ágar pré-esterilizado em frascos. Para reconstituição e adição do antibiótico, seguir as instruções do fabricante (“Microbiology Laboratories, LLC”). Não aquecer excessivamente o antibiótico cefsulodina. O pH final do ágar Coliscan é $7,00 \pm 0,20$.

5.4.2.1.6 Meio m-FC (com ou sem ágar) para contagem de coliformes fecais em águas brutas para captação. Não autoclavar. Aquecer o meio até próximo ao ponto de ebulição. O pH final é $7,4 \pm 0,2$.

5.4.2.1.7 Meios preparados devem ser mantidos na geladeira. Recomenda-se que as placas de Petri contendo meios sejam mantidas em sacos plásticos ou recipientes hermeticamente fechados e que sejam utilizadas em duas semanas. Recomenda-se que, antes do uso, os meios esterilizados mantidos na geladeira atinjam a temperatura ambiente. Devem ser descartadas placas com caldos preparados no laboratório após 96 horas, placas com ágar para MF, após duas semanas, e caldo M-Endo em ampolas ou outros meios preparados, de acordo com a data de validade fornecida pelos fabricantes. Descartar caldos, placas ou ampolas se for detectado algum tipo de crescimento ou brilho metálico na superfície do ágar M-Endo. Registrar a data e a hora do preparo.

5.4.2.2 Condições de incubação e cor das colônias dos meios de MF

Meio	Incubação	Coliformes totais ¹	<i>E.coli</i>
Meio M-Endo ou Ágar M-Endo LES	35°±0,5°C por 22-24 h	Colônias com brilho metálico (presuntivas)	NA
M-ColiBlue 24	35°±0,5°C por 24 h	Colônias vermelhas	Colônias de coloração azul a púrpura
MI	35°±0,5°C por 24±2 h	Colônias fluorescentes sob luz UV	Colônias azuis sob iluminação normal
Chromocult	36°±1,0°C por 24 ±1h	Colônias de cor salmão a vermelha	Colônias de coloração azul a violeta ²
Coliscan	32°-37°C por 24-28 h	Colônias de cor vermelha a magenta	Colônias de coloração azul-púrpura
M-FC	44,5°±0,2°C por 24±2 h	NA	Colônias azuis (coliformes fecais)

¹Não indica a presença de *E.coli*. Se uma colônia de *E.coli* estiver presente, será contada como colônia positiva para coliformes totais.

²Se a confirmação de *E.coli* for desejada, adicionar uma gota do reativo de Kovacs a cada colônia azul a violeta; a formação de cor vermelho-cereja em alguns segundos confirma a presença de *E.coli*.

5.4.2.3 Cancelamento de amostras de águas para consumo humano negativas para coliformes totais

Todas as amostras que resultam em crescimento confluyente ou em número excessivo de colônias para contagem devem ser canceladas, a não ser que sejam detectados coliformes totais. Se os coliformes totais não forem detectados, relatar o resultado como “crescimento confluyente” ou “número excessivo de colônias para contagem” e requisitar outra amostra do mesmo local. Crescimento confluyente é definido como crescimento bacteriano contínuo cobrindo toda a superfície da membrana, sem evidências da presença de coliformes. Número excessivo de colônias para contagem é definido como um número de colônias maior que 200 na membrana, na ausência de coliformes detectáveis. Os Laboratórios não devem cancelar as amostras quando a membrana contiver pelo menos uma colônia do tipo coliforme (isto é, colônia com brilho metálico no meio endo, azul ou vermelha no ágar m-ColiBlue 24, azul ou fluorescente no ágar MI, de cor salmão a vermelho ou azul-escuro a violeta para o ágar Chromocult Coliform, rosa a magenta ou azul a púrpura no Coliscan). (Antes do cancelamento, o Laboratório pode fazer um teste de verificação na cultura negativa para coliformes totais e um teste para coliformes fecais ou *E.coli*) Se o teste de verificação for positivo, a amostra deve ser relatada como positiva para coliformes totais. Se o teste for negativo, a amostra deve ser cancelada. Se o resultado for positivo para coliformes fecais *E.coli*, a amostra é considerada positiva para coliformes totais, fecais ou *E.coli*, mesmo que o teste de confirmação para coliformes totais tenha sido negativo.

5.4.2.4 Cancelamento de amostras de águas brutas para captação (SWTR): os Laboratórios devem cancelar amostras que resultem em crescimento confluyente ou número excessivo de colônias para contagem, mesmo quando coliformes totais ou fecais estejam presentes, porque a densidade de coliformes deve ser determinada.

5.4.2.5 Para amostras de águas de consumo humano (para verificar colônias nos meios tipo Endo): Pelo menos cinco colônias típicas com brilho metálico e cinco colônias não-típicas devem ser verificadas utilizando um caldo lauril triptose ou lactosado (CLT ou CL) e a seguir em caldo verde brilhante e bile 2% (CLVBB). Como alternativa, as colônias com brilho metálico podem ser verificadas pelo uso de um procedimento com citocromo oxidase ou β -galactosidase. As colônias individuais podem ser transferidas com alça ou agulha de platina, ou palito de madeira estéril. Na ausência de colônias com brilho metálico, verificar até cinco colônias vermelhas com brilho questionável e cinco colônias vermelhas sem brilho, representando diferentes tipos morfológicos. Outro procedimento possível é transferir com um “swab” todo o crescimento da superfície da membrana e inoculá-lo no meio de verificação (CLT e então CLVBB).

5.4.2.6 Para amostras de águas de consumo humano: colônias positivas para coliformes totais devem ser testadas para *E.coli* ou coliformes fecais. As técnicas de membrana filtrante aprovadas pela EPA para esses microrganismos não requerem testes adicionais, exceto aquela que utiliza meios tipo Endo (meio M-Endo ou ágar M-Endo LES). A EPA aprovou várias opções para testar a presença de coliformes fecais ou *E.coli* em culturas positivas para coliformes totais nos meios tipo Endo. Quando se utiliza o meio EC (para coliformes fecais) ou EC-MUG (para *E.coli*) as colônias devem ser transferidas empregando-se uma das opções descritas na “Total Coliform Rule” em 40 CFR 141.21 (f) (5) (Anexo). Com a técnica do “ swab”, um único “swab” pode ser usado para inocular um cultura presuntiva para coliformes totais em até três diferentes meios (por ex. EC ou EC-MUG, CLT e CLVBB, nessa ordem). Se for utilizado o ágar nutriente + MUG, ver o item 5.4.3.

5.4.2.7 Para amostras águas de consumo humano para captação: as contagens iniciais de coliformes totais devem ser calculadas novamente com base nos testes de verificação, conforme citado no “Standard Methods”, Seção 9222b(5) (APHA 1998).

CQ 5.4.2.8 Para amostras de águas brutas para captação (SWTR): se dois ou mais analistas realizarem as análises, recomenda-se que cada um deles conte mensalmente as colônias de coliformes totais ou fecais na mesma membrana. As contagens não devem divergir em mais de 10%

5.4.3 Teste Ágar Nutriente + MUG (para detecção de *E.coli* em águas de consumo humano ou subterrâneas)

5.4.3.1 O meio deve ser autoclavado a 121°C por 15 minutos. O MUG pode ser adicionado ao ágar nutriente antes da autoclavação. O produto pronto pode ser obtido comercialmente. A concentração final de MUG deve ser 100µg/L. O pH final é 6,8±0,2.

CQ 5.4.3.2 Recomenda-se o teste de controles positivos e negativos, conforme determinado no item 5.1.6.4. Filtrar ou aplicar as culturas-controle na membrana filtrante dos meios ágar M-Endo LES, caldo M-Endo ou ágar, e incubar a 35°±0,5°C por 24 horas. Transferir então a membrana para ágar nutriente + MUG e incubar a 35°C por mais quatro horas. Ler e registrar os resultados.

5.4.3.3 A(s) membrana(s) filtrante(s) contendo as colônias de coliformes devem ser transferidas do meio presuntivo para coliformes totais para a superfície do meio ágar nutriente + MUG. Cada colônia com brilho metálico deve ser marcada de forma indelével na tampa da placa. Tampa e base também devem ser marcadas com um traço, de forma que possam ser realinhadas após a remoção da tampa. (Parte da colônia pode ser transferida com uma agulha para o meio de verificação de coliformes totais antes da transferência da membrana para o ágar nutriente + MUG, ou após a incubação de quatro horas. Outro método é transferir todo o crescimento da superfície da membrana com um “swab” estéril após o tempo de incubação de quatro horas no ágar nutriente + MUG para o meio de verificação de coliformes).

5.4.3.4 O meio inoculado deve ser incubado a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por quatro horas.

5.4.3.5 Verificar a fluorescência utilizando uma lâmpada ultravioleta (365-366nm) com bulbo de 6 W em ambiente escuro. Um halo fluorescente na colônia com brilho metálico indica que se trata de colônia positiva para *E.coli*.

5.4.4 Método de MF para detecção de enterococos/estreptococos fecais em águas subterrâneas

5.4.4.1 Meios

5.4.4.1.1 Para o ágar ME (SM 9230C) para detecção de enterococos: preparar a base ágar ME. Autoclavar e resfriar a $44^{\circ}\text{--}46^{\circ}\text{C}$ em banho-maria. Dissolver 0,48g de ácido nalidíxico em 10mL de água purificada contendo 0,4mL de NaOH 10N e misturar. Esterilizar essa solução por filtração e adicionar 5,2mL da mesma para cada litro da base ágar ME. Para o cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) adicionar 0,25g de TTC a 25mL de água purificada e aquecer até a dissolução. Esterilizar essa solução por filtração e adicionar 15mL por litro da base ágar ME. O pH final é $7,1\pm 0,2$.

5.4.4.1.2 Para o ágar m-Enterococcus (SM 9230C) para a detecção de estreptococos fecais (não enterococos). Aquecer para dissolver os ingredientes, mas não autoclavar. Distribuir em placas de Petri estéreis (9X50mm) (cerca de 4mL) e deixar solidificar. O pH final é $7,2\pm 0,2$.

5.4.4.1.3 Para o ágar mEI (Método EPA 1600) para a detecção de enterococos: adicionar 0,75g de indoxil β -D-glicosídeo a 1L de base ágar ME, e proceder conforme o item 5.4.4.1.1, exceto pela preparação do TTC que deve ser feita da seguinte forma: adicionar 0,1g de TTC a 10mL de água purificada e aquecer para dissolver. Esterilizar essa solução por filtração e adicionar 2mL para cada litro de meio. O pH final é $7,1\pm 0,2$.

5.4.4.2 Após a filtração de 100mL da amostra, colocar a membrana em placas de Petri contendo um dos meios sólidos mencionados. Não são normalmente necessárias diluições seriadas para detectar os enterococos em águas subterrâneas.

5.4.4.3 Se for usado o ágar m-Enterococcus incubar a placa invertida a $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e usando uma lâmpada fluorescente e aumento, contar todas as colônias vermelho-escuras e vermelho claras como estreptococos fecais.

5.4.4.4 Se for usado o ágar mE, incubar a placa invertida por 48 horas a $41\pm0,5^{\circ}\text{C}$ e então transferir a membrana para o meio EIA. Incubar a $41\pm0,5^{\circ}\text{C}$ por 20-30 minutos e utilizando aumento e uma lâmpada fluorescente, examinar as colônias. Colônias rosa a vermelha no ágar mE, com halo de precipitação negro ou castanho-avermelhado na parte de baixo da membrana no EIA, são positivas para enterococos.

5.4.4.5 Se o ágar mEI for usado, incubar a placa invertida por 24 horas a $41\pm0,5^{\circ}\text{C}$. Utilizando aumento e uma pequena lâmpada fluorescente, examinar a superfície e o fundo da placa quanto à presença de colônias com halo azul. Considera-se que uma colônia com halo azul, independentemente da cor, pertence ao grupo dos enterococos.

5.5 Contagem de bactérias heterotróficas (para quantificação em águas para consumo humano)

5.5.1 O método de inoculação em profundidade (“Standard Methods” 9215B) ou o método SimPlate devem ser usados para atendimento a padrões de qualidade (40 CFR 141.74 (a)(1)) (Anexo), e recomenda-se que esses métodos também sejam utilizados para testar a água purificada. Para sistemas aos quais foi permitida uma variação do nível máximo de contaminante da “Total Coliform Rule” (ver critérios de variação no preâmbulo de FR 56:1556-1557, janeiro 15, 1991), qualquer um dos métodos mencionados no “Standard Methods”, Seção 9215, Contagem de Bactérias Heterotróficas pode ser usado com o meio R2A, para contagem de bactérias heterotróficas em águas de consumo humano.

5.5.2 Meios

Método	Meio	pH final
Inoculação em profundidade	Ágar triptona, glicose, extrato de levedura (“Plate Count Agar”)	$7,0\pm0,2$
Inoculação em profundidade	Ágar R2A	$7,2\pm0,2$
Inoculação em superfície	Ágar R2A	$7,2\pm0,2$
Membrana filtrante	Ágar R2A	$7,2\pm0,2$
SimPlate	Substrato multienzimático	$7,2\pm0,2$

5.5.3 (Método de inoculação em profundidade): o ágar fundido deve estar com a temperatura de 44° a 46°C em banho-maria antes da distribuição nas placas, porém somente pode ser assim mantido por três horas no máximo. O ágar estéril não deve ser fundido mais de uma vez.

5.5.4 (Método de inoculação em superfície): 15mL do ágar R2A (ou outro meio) devem ser distribuídos em placas de Petri (100x15mm ou 90x15mm) e solidificados.

5.5.5 O meio refrigerado pode ser mantido em frascos ou tubos com tampa de rosca por até seis meses, ou em placas de Petri por até duas semanas. Placas de Petri com o meio R2A podem ser armazenadas por uma semana.

5.5.6 Para a maioria das amostras de água potável, placas contáveis podem ser obtidas com volumes de 1,0mL ou 0,1mL, ou ambos, da amostra não-diluída (as diluições podem não ser necessárias para a SimPlate, que possui uma limite de contagem até 738/mL). Recomenda-se o preparo de pelo menos duas placas por diluição.

5.5.7 (Método de inoculação em profundidade) a amostra deve ser pipetada assepticamente no fundo de uma placa de Petri estéril. A seguir, devem ser adicionados 10-12mL de ágar fundido com a temperatura estabilizada a 44°-46°C a cada placa. Meio e amostra devem ser então misturados cuidadosamente para evitar derramamento do conteúdo da placa. Após a solidificação do meio em uma superfície plana, as placas devem ser invertidas e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. Recomenda-se que as placas sejam empilhadas até no máximo, quatro, e colocadas na incubadora de forma a permitir uma circulação adequada do ar, e manter uniforme a temperatura de incubação. Evitar umidade excessiva na incubadora para reduzir a possibilidade de formação de colônias invasoras no ágar. Evitar igualmente o ressecamento excessivo do meio; o ágar não deve perder mais de 15% de umidade durante o período de incubação de 48 horas.

5.5.8 (Método de inoculação em superfície): 0,1mL ou 0,5mL da amostra (ou de sua diluição) são pipetados na superfície do ágar previamente seco, a seguir esse líquido é espalhado sobre o meio utilizando-se uma alça de vidro estéril inclinada. O inóculo deve ser totalmente absorvido pelo ágar antes que a placa seja invertida e incubada a 20°-28°C durante 5-7 dias.

5.5.9 (Método de filtração em membrana) O volume a ser filtrado deve resultar em 20-200 colônias. A membrana é então transferida para uma placa de Petri contendo 5mL do ágar R2A solidificado, que é incubada a 20°-28°C durante 5-7 dias. Quando são utilizadas placas com tampas frouxas, recomenda-se que sejam colocadas em caixas plásticas com tampas herméticas, contendo papel toalha umedecido. O papel toalha deve ser umedecido novamente quando necessário para manter a umidade. As colônias devem ser contadas com um microscópio estereoscópico no aumento de 10-15X.

5.5.10 (Para o método SimPlate)

5.5.10.1 Dose única (para uma amostra) adiciona-se um volume de 10mL de amostra ao tubo contendo o meio desidratado SimPlate. A seguir, o meio dissolvido pode ser vertido no centro de uma placa (fornecida pelo fabricante, Idexx Laboratories Inc.) contendo 84 pequenas cavidades. Como procedimento alternativo, pode-se adicionar 9mL de diluente estéril (água deionizada, destilada ou tamponada) [“Standard Methods” 9050C, 1a] ao tubo, e em seguida, 1mL da amostra. Distribuir homogeneamente a mistura nas 84 cavidades da placa e drenar o excesso de líquido para um disco absorvente sobre a placa. Inverter então a placa (o líquido é mantido em cada cavidade por tensão superficial) e incubar por 45-72 horas a $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$. A densidade bacteriana é determinada pela contagem do número de cavidades fluorescentes sob luz UV de 365-366nm e conversão desse valor para um NMP constante na tabela de Dose Única fornecida pelo fabricante. Se for utilizado um volume de 10mL de amostra, ler o NMP de Dose Única diretamente. Para volumes de 1,0mL de amostra, corrigir o NMP multiplicando o valor por dez.

5.5.10.2 Doses múltiplas (para dez amostras de 1mL) cada: adiciona-se um volume de 100mL de diluente estéril ao meio desidratado SimPlate, agitando-se bem para a dissolução completa. A seguir, pipetar 1,0mL de amostra no centro da placa de 84 cavidades e 9,0mL do meio reconstituído. Girar a placa com movimentos suaves para misturar a amostra e o meio, e distribuir a mistura uniformemente nas 84 cavidades. Continuar então com o procedimento descrito no item 5.5.10.1, exceto que se deve ser utilizar a tabela de Doses Múltiplas fornecida pelo fabricante para determinar o NMP/mL. Caso a amostra tenha sido diluída, multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

5.5.11 (Técnicas de inoculação em profundidade e superfície) As colônias são contadas manualmente, com o uso de um contador de campo escuro. Somente as placas que contêm 30 a 300 colônias devem ser selecionadas para contagem, exceto aquelas placas inoculadas com 1,0mL da amostra não diluída. Contagens inferiores a 30 para tais placas são aceitáveis. (Contadores automáticos não podem ser empregados devido ao tamanho e baixo número de colônias observado quando se realiza a contagem de bactérias heterotróficas em água potável).

CQ 5.5.12 Recomenda-se que cada lote ou frasco de ágar seja verificado quanto à esterilidade, preparando-se uma placa final de controle. Os dados devem ser rejeitados se esse controle apresentar contaminação.

5.6 Colifagos (minuta dos métodos 1601 e 1602, “Ground Water Rule”, em proposição)

Nota: Tratam-se de Métodos baseados em desempenho para detecção da presença de Colifagos F-específicos e somáticos em águas subterrâneas e outros tipos de águas.

(**Métodos** baseados em desempenho: Tendo em vista a variedade de situações nas quais alguns métodos são aplicados, e o avanço tecnológico contínuo, alguns métodos baseiam-se em desempenho. Um método baseado em desempenho permite a modificação ou a omissão de etapas ou procedimentos, desde que todas as exigências referentes ao desempenho do método validado sejam cumpridas. As etapas que não podem ser modificadas ou omitidas devem estar especificadas no método.)

5.6.1 Método EPA 1601: Colifagos F-específicos e somáticos em águas pela técnica de enriquecimento em duas etapas:

Resumo do método: Um volume de 100mL ou de 1L de amostra é suplementado com cloreto de magnésio, cultura hospedeira em fase log de crescimento (*E.coli* F_{amp} para colifagos F-específicos e *E.coli* CN-13 para colifagos somáticos). Após incubação “overnight”, as amostras são aplicadas sobre uma camada da bactéria hospedeira específica para cada tipo de colifago, a placa é incubada e examinada quanto à presença de zonas de lise circulares, que indicam a presença de colifagos.

5.6.1.1. Meios

5.6.1.1.1 Estoques de antibióticos: os antibióticos sempre devem ser adicionados ao meio **após** a autoclavação. Manter congelado a -20°C por um ano no máximo. Descongelar na temperatura ambiente ou rapidamente em banho-maria a 37°C, no momento do uso. **Observação importante:** *Antibióticos podem ser tóxicos. Usar roupas protetoras adequadas, luvas, proteção facial e ocular, e manipular em capela de segurança química.*

5.6.1.1.2 Caldo triptona e soja 10X (CTS): manter a 1°-5°C até o uso.

5.6.1.1.3 Ágar triptona e soja 1,5% (ATS): se não for utilizado imediatamente após a adição do antibiótico e solidificação, manter as placas invertidas a 1°-5°C até duas semanas no máximo.

5.6.1.1.4 Tubos com ágar ATS de superfície 0,7% com os antibióticos apropriados: distribuir 5mL em tubos estéreis de 10mL, rotular e manter a 45°-48°C até o uso. Esses tubos devem ser utilizados no dia do seu preparo.

5.6.1.1.5 Placas: poderá ocorrer acúmulo de água de condensação nas bordas das placas onde serão aplicadas as amostras que poderá pingar sobre a superfície do ágar se a placa for inclinada, alterando o padrão de aplicação. Se isto ocorrer, incubar as placas por cerca de dez minutos antes da inoculação para reduzir a condensação. As placas podem ser usadas no dia do preparo ou armazenadas a 1°-5°C por quatro dias no máximo.

5.6.1.2 Estoque de colifagos

5.6.1.2.1 Estoque de colifagos MS2 (ATCC 15597-B1, F-específicos) e phi-X 174 (ATCC 12706-B1, somáticos). Podem ser mantidos a 2°-8°C por cinco anos no máximo. Preparação inicial do estoque puro de colifagos está disponível em <http://www.atcc.org>.

5.6.1.2.2 Iniciar a análise de esgoto bruto filtrado no período de 24 horas após a coleta.

5.6.1.2.3 Deixar o esgoto bruto sedimentar a 1°-5°C durante uma a três horas, para facilitar a filtração.

5.6.1.2.4 Montar o sistema de filtração sobre um tubo de polipropileno com tampa de rosca, estéril, de 15mL. Inserir o êmbolo na seringa e impulsionar o esgoto através da membrana para o tubo estéril. Substituir a membrana quando ocorrer obstrução e continuar filtrando até a obtenção de pelo menos 10mL de esgoto filtrado (várias membranas podem ser necessárias).

5.6.1.2.5 Se o filtrado for armazenado por mais de 24 horas, o esgoto deverá ser titulado novamente.

5.6.1.3 Culturas estoque das bactérias hospedeiras

5.6.1.3.1 Culturas estoque congeladas das bactérias hospedeiras: após a preparação, congelar as culturas estoque a -70°C, se possível. As culturas podem ser congeladas a -20°C se não for possível o congelamento a -70°C. As bactérias hospedeiras podem ser mantidas por até um ano a -70°C e por dois meses na temperatura de -20°C.

5.6.1.3.2 Culturas estoque “overnight” das bactérias hospedeiras: após a preparação, resfriar em gelo ou a 1°-5°C até o uso.

5.6.1.3.3 Culturas estoque em fase log de crescimento das bactérias hospedeiras-Após a preparação, resfriar em gelo ou a 1°-5°C para diminuir a replicação até o uso. A suspensão pode ser mantida por até 48 horas. Entretanto, melhores resultados são obtidos quando as culturas são usadas imediatamente (dentro de seis horas). Manter o restante da cultura bacteriana “overnight” a 1°-5°C para preparar novas suspensões em fase log de crescimento.

5.6.1.4 Controle de qualidade-instruções gerais

5.6.1.4.1 Demonstração inicial de capacidade (DIC). *O laboratório deve demonstrar capacidade de desempenho aceitável desse método realizando um teste DIC antes de analisar amostras de campo.* O teste DIC consiste na análise de dez amostras de água purificada contaminadas com esgoto ou material equivalente, na densidade de 1-2 UFP em cada amostra, para cada tipo de colifago usado, de acordo com a tabela DIC apresentada a seguir. Um número mínimo de amostras deve ser positivo, dependendo do tipo de colifago. Contaminar o volume total de amostra na concentração indicada na tabela. Esses testes devem ser acompanhados de um branco do método para cada tipo de colifago.

5.6.1.4.2 Brancos do método. *O Laboratório deve analisar brancos do método (amostra de água purificada) para demonstrar ausência de contaminação.* Para cada tipo de colifago usado preparar e analisar amostras de água purificada estéril utilizando o mesmo procedimento das análises de

campo ou **CQ**. No mínimo, o Laboratório deverá analisar um branco do método para cada placa utilizada para aplicação das amostras de campo. Para aumentar a possibilidade de determinar se a contaminação cruzada realmente existe, aplicar a amostra estéril (branco) sobre a camada de bactéria hospedeira imediatamente após a aplicação do controle positivo.

5.6.1.4.3 Controles positivos. *O Laboratório deve analisar controles positivos para assegurar que as suspensões estoque de colifagos, suspensões das bactérias hospedeiras e o meio de crescimento estão funcionando adequadamente.* Para cada tipo de colifago usado, uma amostra de 100mL de água purificada deve ser contaminada com 20 UFP (esgoto filtrado) ou 60 UFP (solução estoque pura de colifagos). O laboratório deve aplicar um controle positivo para cada placa contendo amostras de campo. Se várias placas são inoculadas com amostras no mesmo dia, uma única amostra de controle positivo enriquecido pode ser aplicada nas várias placas preparadas naquele dia.

5.6.1.4.4 Contaminação de matrizes (CM). *Para avaliar o desempenho do método em determinado tipo de amostra de água, o laboratório deve analisar um conjunto de amostras CM para cada tipo de colifago, na primeira vez que são recebidas amostras de águas subterrâneas de um tipo que o laboratório nunca analisou antes.* Para cada tipo de colifago utilizado, três amostras de campo são contaminadas com 1-2 UFP. Pelo menos uma de três amostras CM, para cada tipo de colifago, deve ser positiva, para que o desempenho do método seja considerado aceitável para aquele tipo de água subterrânea. Se os resultados de CM não forem aceitáveis e os resultados das amostras da DCC e dos controles positivos associados com aquele lote de amostras forem aceitáveis, uma interferência da matriz pode ser a causa dos resultados insatisfatórios. Além disso, o laboratório deve analisar um conjunto de amostras CM constantemente, após cada vigésima amostra de campo para cada tipo de água subterrânea. (Por exemplo, quando o laboratório recebe a primeira amostra de um tipo, devem ser obtidas alíquotas adicionais de campo para o teste CM. Quando o laboratório recebe a vigésima amostra desse local, alíquotas adicionais devem ser coletadas e contaminadas). As amostras para CM são coletadas simultaneamente às amostras de campo. Contaminar o volume total da amostra nas concentrações indicadas nas tabelas DCC e CM a seguir.

5.6.4.1.5 Demonstração contínua de capacidade (DCC). *O laboratório deve demonstrar que o sistema analítico está sob controle constante analisando amostras DCC.* Para cada tipo de colifago utilizado, três amostras de água purificada são contaminadas com 1-2 UFP. As amostras DCC são analisadas exatamente como as amostras de campo, e no mínimo uma das três deve ser positiva para cada tipo de colifago utilizado. Caso contrário, o desempenho do método não é aceitável, e a análise de amostras de campo deve ser interrompida. Identificar, corrigir o problema e demonstrar desempenho aceitável analisando outras amostras DCC. O laboratório deve analisar um conjunto de amostras DCC após 20 amostras (de campo e CM), ou semanalmente, o que ocorrer com maior frequência. Contaminar o volume total de amostra nas concentrações indicadas na tabela DCC e CM a seguir

5.6.1.4.6 Estudos de desempenho. Recomenda-se que periodicamente o Laboratório analise uma amostra externa para **CQ**, para avaliação de desempenho, caso este tipo de amostra seja disponível. Recomenda-se igualmente que o laboratório participe de estudos interlaboratoriais de desempenho, organizados por entidades locais, estaduais, federais ou particulares. O Laboratório deve avaliar esses resultados, corrigir o desempenho insatisfatório e registrar ações corretivas.

Demonstração inicial de capacidade (DIC) para o Método 1601

Tipo de colifago	Volume de amostra ¹	Concentração desejada (UFP/amostra)	Volume total a ser contaminado	Concentração total (UFP/ volume total)	Número mínimo de amostras positivas em 10
F ⁺	100mL	1,3	1000mL	13	5
Somáticos	100mL	1,5	1000mL	15	5

¹ A “Ground Water Rule” requer um volume de 100mL de amostra. Entretanto, para a maior parte dos objetivos, esse teste pode ser usado com volume de amostra de 1L. Como as amostras DIC são analisadas da mesma forma que as amostras de campo, incluindo volumes analisados, as análises DIC devem ser realizadas no volume de 1L quando o laboratório está analisando esse volume de amostras de campo (o procedimento DIC para 1L de amostra pode ser obtido no protocolo do Método 1601, Tabela 1).

Condições de contaminação das amostras DCC e CM requeridas para avaliação contínua de desempenho do Método 1601

Tipo de colifago	Volume de amostra ¹	Concentração desejada (UFP/amostra)	Número de amostras que devem ser contaminadas (≥1 deve ser positiva)	Volume total a ser contaminado	Concentração total (UFP/volume total)
F ⁺	100mL	1,3	3	300mL	3,9
Somático	100mL	1,5	3	300mL	4,5

¹ A “Ground Water Rule” requer um volume de 100mL de amostra. Entretanto, para a maior parte dos objetivos, esse teste pode ser usado com volume de amostra de 1L. Como as amostras DCC e MS são analisadas da mesma forma que as amostras de campo, incluindo volumes, analisar DCC e MS no volume de 1L quando o laboratório estiver analisando esse volume de amostras de campo (o procedimento DCC e MS para 1L de amostra pode ser obtido no protocolo do Método 1601, Tabela 2).

5.6.2 Método EPA 1602-Colifagos F-específicos e somáticos em águas pela técnica de camada simples de ágar (CSA)

Resumo do método: Trata-se de método baseado no desempenho para detecção ou quantificação de colifagos F-específicos (F⁺) e somáticos em águas subterrâneas e outras águas. Analisa-se um volume de 100mL de água subterrânea adicionando-se cloreto de magnésio e a bactéria hospedeira (*E.coli* F_{amp} para o colifago F⁺ e *E.coli* CN-13 para colifagos somáticos) e em seguida junta-se a mistura amostra/bactéria hospedeira a 100mL de ágar triptona e soja concentração dupla fundido e contendo o antibiótico apropriado. Após homogeneização, todo esse volume é vertido em cinco ou dez placas (dependendo do tamanho da placa). Após a incubação “overnight” verificar a presença de zonas circulares de lise, que indicam a presença de colifagos.

5.6.2.1 Meios. Ver item 5.6.1 para soluções estoque de antibióticos, caldo triptona e soja 10X (CTS), tubos com ágar triptona e soja de superfície (ATS) 0,7% com os antibióticos apropriados e placas.

5.6.2.1.1 Ágar triptona e soja concentração dupla (ATS 2X): o meio pode tornar-se escuro após a autoclavação, mas não devem ocorrer alterações no seu desempenho devido a esse fato.

5.6.2.1.2 ATS 2X com os antibióticos apropriados: manter fundido a 45°-48°C em banho-maria até o uso. O ágar deve ser usado no dia da preparação.

5.6.2.2 Estoque de colifagos : ver item 5.6.1.2.

5.6.2.3 Culturas estoque de bactérias hospedeiras – ver item 5.6.1.3

5.6.2.4 Controle de qualidade-aspectos gerais

5.6.2.4.1 Precisão e recuperação iniciais (PRI). *O laboratório deve demonstrar a capacidade de realizar esse método de forma aceitável, realizando um teste PRI antes de analisar quaisquer amostras de campo.* Quatro amostras de água purificada para cada tipo de colifago usado são necessárias para o teste PRI. O volume total de amostras PRI deve ser contaminado para obter-se uma concentração de 80 UFP/amostra. Essa contaminação deve ser realizada com esgoto filtrado ou material equivalente. O desvio padrão relativo da recuperação (DPRT) e a percentagem média de recuperação $\bar{x}$ baseada nos resultados das quatro amostras para cada tipo de colifago devem atender aos critérios de aceitação de **CQ** da tabela a seguir.

5.6.2.4.2 Brancos do método *O laboratório deve analisar brancos do método (amostra de água purificada) para demonstrar ausência de contaminação.* O laboratório deve analisar um branco do método para cada lote analítico. Para cada tipo de colifago usado, preparar e analisar uma amostra de água purificada utilizando o mesmo procedimento usado para as análises de campo ou de **CQ**. Define-se lote analítico como todas as amostras analisadas durante um único dia, até um máximo de 20 (amostras de campo e amostras de contaminação de matriz) por tipo de colifago.

5.6.2.4.3 Contaminação de matrizes (CM). *Para avaliar o desempenho do método em determinado tipo de amostra de água, o laboratório deve analisar um conjunto de amostras CM para cada tipo de colifago, na primeira vez que são recebidas amostras de águas subterrâneas de um tipo que o laboratório nunca analisou antes.* A análise CM é realizada numa alíquota adicional da amostra coletada da mesma água subterrânea e no mesmo tempo que a amostra de campo. Se o laboratório analisa rotineiramente amostras de diferentes águas subterrâneas, uma análise CM deve ser realizada a cada 20 amostras de campo. Por exemplo, quando recebe a primeira amostra de uma água subterrânea, o Laboratório deve obter uma segunda alíquota dessa amostra para ser analisada como CM. Quando o laboratório receber a vigésima amostra desse local, uma alíquota separada dessa amostra deve ser coletada e contaminada. Comparar a recuperação com os limites correspondentes na tabela de **CQ** a seguir. Se a recuperação de colifagos estiver abaixo desses limites, o desempenho do método não é aceitável para aquela amostra. Se os resultados de PRC associados a esse lote de amostras estiverem dentro dos limites de controle, uma interferência da matriz pode ser a causa da recuperação insatisfatória. Se os resultados de PRC não estiverem dentro dos limites de controle, o desempenho do método não é aceitável (ver item 5.6.2.4.4). Identificar e corrigir o problema, e repetir a análise das amostras de contaminação da matriz e de campo

correspondentes. Manter os resultados da recuperação numa carta controle e atualizá-la regularmente.

5.6.2.4.4 Precisão e recuperação contínua (PRC). *O laboratório deve demonstrar continuamente desempenho aceitável analisando uma amostra PRC.* Para cada tipo de colifago usado uma amostra de água purificada é contaminada com cerca de 80 UFP. A amostra PRC é analisada exatamente como uma amostra de campo. O laboratório deve analisar uma amostra PRC a cada lote analítico. Define-se um lote analítico como todas as amostras analisadas durante um dia, até o número máximo de 20 (amostras de campo e de contaminação de matriz por tipo de colifago usado). **Observar que:** a PRC serve apenas como um controle positivo para o método 1602. Comparar a recuperação percentual da PRC com os limites correspondentes para precisão e recuperação contínua na tabela **CQ** a seguir. Se R atende aos critérios de aceitação, o desempenho do sistema é aceitável e a análise de amostras pode continuar. Se R estiver fora da faixa de recuperação, o desempenho do método não é aceitável e a análise de amostras de campo deve ser interrompida. Identificar, corrigir o problema e demonstrar desempenho aceitável pela análise satisfatória de outro teste PRC antes de continuar com as análises de amostras de campo.

5.6.2.4.5 Estudos de desempenho. Recomenda-se que periodicamente o laboratório analise amostras externas de **CQ**, como se fossem amostras para avaliação de desempenho, caso este tipo de amostra esteja disponível. Recomenda-se igualmente que o laboratório participe de estudos interlaboratoriais de desempenho, organizados por entidades locais, estaduais, federais ou particulares. O laboratório deve avaliar esses resultados, corrigir um desempenho insatisfatório e registrar ações corretivas.

Critérios de aceitação para controle de qualidade do Método 1602

Teste de desempenho	Critérios de aceitação para colifagos F-específicos	Critérios de aceitação para colifagos somáticos
Precisão e Recuperação Inicial (PRI)		
Percentagem média de recuperação	9% - 130%	86% -177%
Precisão (desvio padrão relativo máximo)	46%	23%
Percentagem de recuperação na precisão e recuperação contínua (PRC)	4% - 135%	79% - 183%
Contaminação da matriz (CM)		
Porcentagem de recuperação da CM	Detectado – 120%	48% -291%
Contaminação da matriz, duplicata de contaminação da matriz (CM/DCM)		
Percentagem de recuperação média para CM/DCM	Detectado – 120%	48% - 291%
Precisão (percentagem da diferença máxima relativa de /DCM)	57%	28%

6 Coleta, manipulação e conservação de amostra

Os itens 6.1 a 6.5 aplicam-se aos laboratórios que coletam amostras. Entretanto, recomenda-se que todos os laboratórios façam esforços para garantir que a coleta seja realizada de forma adequada conforme o item 6.6.

6.1 Coletor de amostras

Recomenda-se que o coletor de amostras seja treinado em técnicas de coleta asséptica de amostras, e, se necessário, aprovado pela autoridade reguladora competente ou seu representante.

6.2 Amostragem

6.2.1 (Para TCR) As amostras devem ser representativas do sistema de distribuição de água. As torneiras usadas para amostragem não devem ter aeradores, retentores, misturadores e sistemas de purificação. Recomenda-se a amostragem em torneiras de água fria. O encanamento deve ser limpo antes da amostragem, mantendo-se um fluxo contínuo de água durante pelo menos dois minutos (até ser atingida a temperatura constante da água). Pelo menos 100mL de amostra devem ser coletados, deixando-se um espaço livre de dois centímetros para facilitar a homogeneização da amostra por agitação. Recomenda-se que imediatamente após a coleta, um formulário seja preenchido (item 6.5). Ver o item 3.1.5.4 com referência à eliminação de cloro da amostra. Se o frasco estiver excessivamente cheio para permitir a homogeneização adequada, não descartar uma porção da amostra, mas, sim, verter todo o conteúdo em um recipiente maior, misturar adequadamente e continuar com a análise.

6.2.2 (Para SWTR) Amostras de águas brutas para captação devem ser representativas do manancial, coletadas não muito distante do ponto de captação, porém a distância razoável da margem. O volume de amostra deve ser suficiente para realizar todas as análises solicitadas.

6.2.3 (Para análise de colifagos segundo a GWR) Analisar um volume de 100mL de amostra para o ensaio. A coleta de um volume adicional de 100mL permite uma nova análise, (ex., se o controle positivo ou negativo não for satisfatório). Para garantir um volume suficiente de amostra, coletar uma amostra adicional de 50mL.

6.3 Conservação das amostras a baixa temperatura

6.3.1 (Amostras para análise bacteriológica) aconselha-se aos coletores (embora não seja obrigatório) que eles mantenham as amostras de águas de consumo humano à temperatura <10°C durante o transporte ao laboratório. Amostras de águas brutas para captação, em atendimento ao “Surface Water Treatment Rule” (SWTR) devem ser mantidas a <10°C durante o transporte (“Standard Methods”, Seção 9060B). Rejeitar amostras congeladas.

6.3.2 (Para análise de colifagos em atendimento a GWR): despachar as amostras a <10°C usando gelo comum ou gelo reciclado para manter a temperatura, e armazenar a 1°-5°C. Não congelar as amostras.

CQ 6.3.3 As amostras para atendimento ao SWTR e para análise de colifagos devem ter sua temperatura registrada no recebimento. Se uma amostra for recebida em temperatura $>10^{\circ}\text{C}$, esteja ou não em gelo, ela deve ser “assinalada”, exceto se a coleta tiver sido realizada há menos de duas horas.

6.4 Tempo de manutenção e de transporte das amostras

6.4.1 Para análise de coliformes totais em águas de consumo humano, o tempo entre a coleta da amostra e a sua colocação na incubadora não deve exceder 30 horas (conforme 40 CFR 141.21 (f) (3)). Recomenda-se que todas as amostras sejam analisadas no dia do recebimento. Se o laboratório receber a amostra no final do dia, ela pode ser mantida na geladeira “overnight” até que análise seja iniciada no período de 30 horas após a coleta.

6.4.2 Para análises de coliformes totais e fecais em águas superficiais brutas para captação e bactérias heterotróficas em águas de consumo humano, o tempo entre a coleta e a colocação da amostra na incubadora não deve exceder oito horas (conforme 40 CFR 141.74 (a) (1)).

6.4.3 (Para análise de colifagos). O tempo entre a coleta de amostra e sua colocação na incubadora não deve exceder 48 horas. Não exceder 24 horas após a coleta de esgoto destinado à contaminação de amostras para **CQ**, a não ser que seu título seja novamente determinado e não tenha diminuído em mais de 50%. Se esse decréscimo no título não ocorrer, a amostra pode ser mantida por até 72 horas.

6.4.4 (Para *E. coli* e enterococos em atendimento ao GWR). O tempo entre a coleta da amostra e sua colocação na incubadora não deve exceder 30 horas.

6.5 Formulário com informações sobre a amostra

Após a coleta, o coletor preenche um formulário com tinta indelével contendo as seguintes informações:

- Nome do sistema (número de identificação do local do sistema público de água, se disponível)
- Identificação da amostra (se houver);
- Local de coleta da amostra;
- Tipo de amostra (ex., amostra de rotina do sistema de distribuição, recoleta, água, bruta ou do processo de tratamento, ou qualquer outro tipo especial de amostra);
- Data e hora da coleta;
- Análises a serem realizadas;
- Residual de desinfetante;
- Nome do coletor

- Observações

6.6 Cadeia de custódia

Os coletores e o Laboratório devem seguir a legislação referente à cadeia de custódia.

7 Garantia da Qualidade

7.1 Recomenda-se o preparo e a adoção de um plano escrito de GQ. Recomenda-se que esse plano esteja disponível para inspeção pelo auditor. Conforme especificado pelo plano de GQ, recomenda-se que os laboratórios que executam a calibração de equipamentos ou instrumentos (por exemplo, termômetros) tenham um Procedimento Operacional Padronizado para revisão. Se o Laboratório deseja realizar procedimentos adicionais de GQ, além daqueles incluídos nesse Manual, ele deve consultar o “Standard Methods”, Seção 9020, Garantia da Qualidade/Controle de Qualidade, na 20ª ed. – APHA 1998).

7.2 Recomenda-se aos Estados, implantar testes de proficiência (TP) como parte de seu programa de certificação de análises microbiológicas de águas de consumo humano e que pelo menos um lote de amostras TP apresente resultados satisfatórios a cada 12 meses, para cada método certificado.

Nos métodos utilizados para avaliar a presença ou ausência de organismos em uma amostra, cada conjunto de TP deve conter dez amostras, todas enviadas simultaneamente na forma liofilizada, desidratada ou aquosa. O conjunto deve incluir amostras, em várias combinações, contendo coliformes totais, fecais, *E.coli*, bactérias não-coliformes e pelo menos um branco. Cada conjunto deve ser usado apenas uma vez com um único método analítico. Para ter desempenho aceitável, o laboratório deve analisar corretamente um mínimo de nove das dez amostras, sem resultados falso negativos (um único resultado falso-positivo é aceitável).

Como os métodos baseados no mesmo princípio (ex., membrana filtrante) podem ser muito diferentes, recomenda-se que a Região ou o Estado considere a certificação do laboratório somente para aqueles métodos nos quais o laboratório obteve resultados satisfatórios em um conjunto de amostras TP. A tabela a seguir exemplifica essa orientação, e relaciona alguns métodos que podem ter certa similaridade, de forma a permitir que o laboratório seja certificado em mais de um método tendo analisado com sucesso um único conjunto de amostras TP.

Tipo de Método	Método¹
Método de fermentação em tubos	Caldo LTB ou P-A seguido de CLVBB e EC ou EC-MUG
Método de fermentação em tubos	Meio A1 (coliformes fecais, SWTR apenas)
Método com substrato enzimático	Colilert ou Colilert 18
Método com substrato enzimático	Colisure
Método com substrato enzimático	Readycult ou Fluorocult LMX
Método com substrato enzimático	E*Colite
Método com substrato enzimático	Colitag
Método de filtração em membrana	M-Endo ou Endo LES ,CLVBB e EC ou EC-MUG, ou AN-MUG

Tipo de Método	Método ¹
Método de filtração em membrana	Meio MI
Método de filtração em membrana	Coliscan
Método de filtração em membrana	M-ColiBlue24
Método de filtração em membrana	Chromocult
Método de filtração em membrana	agar m-FC (coliformes fecais SWTR apenas)
Contagem de bactérias heterotróficas	agar triptona glicose extrato de levedura (“PCA”)
	SimPlate

¹ Recomenda-se um conjunto separado de amostras de teste de proficiência distinto para cada linha. Um único conjunto de amostras TP englobaria todos os métodos citados nessa linha.

8 Registro e relatórios de resultados

8.1 Defesa Legal: Para que os dados do monitoramento destinado a atender aos padrões de qualidade sejam legalmente defensíveis, recomenda-se a realização de registros exatos. O plano de GC e os POPs descrevem as políticas e os procedimentos utilizados pela instituição para guarda e armazenamento dos registros. Se as amostras vão se tornar parte de uma ação legal, recomenda-se que os procedimentos de cadeia de custódia sejam utilizados.

8.2 Guarda dos registros: Os sistemas públicos de água precisam manter registros das análises microbiológicas de amostras destinadas ao atendimento aos padrões de qualidade, durante pelo menos cinco anos (40 CFR 141.33). Recomenda-se que o laboratório mantenha registros facilmente acessíveis por cinco anos ou até a próxima auditoria, o que for mais longo. A ocorrência de mudança de proprietário, fusão de empresas ou encerramento de atividades, não exclui essa obrigatoriedade. Recomenda-se que o cliente do sistema seja notificado previamente do descarte de registros, de forma que ele possa requisitar uma cópia, se necessário, incluindo dados brutos, cálculos e dados de controle de qualidade. Esses arquivos podem estar impressos em papel, em microfichas ou em arquivo eletrônico. Dados eletrônicos devem sempre ter uma cópia de segurança em fita protegida, disco flexível ou rígido. Se o laboratório modificar seus programas de computador, deve ser providenciada a transferência dos dados anteriores para o novo sistema, de forma que eles possam ser recuperados dentro do período de tempo acima especificado. Dados que podem tornar-se parte de um processo legal serão provavelmente mantidos por tempos mais longos. Verificar com o consultor jurídico da empresa – conselheiro legal (Ref.: *Good automated Laboratory Practices*, EPA 2185, Office of Information Management, Research Triangle Park, NC 27711, 8/10/95).

8.3 Registro de resultados: Registrar os resultados a tinta, e riscar quaisquer alterações de forma que o registro original permaneça visível. Datar e rubricar essas alterações. Recomenda-se que as seguintes informações estejam à disposição imediata num resumo ou qualquer outro tipo de registro:

8.3.1 Formulário de informações da amostra (conforme item 6.5)

8.3.2 Data e hora do recebimento da amostra no Laboratório

8.3.3 Nome da pessoa que recebeu a amostra no Laboratório

8.3.4 Qualquer anormalidade nas condições da amostra. A amostra pode ser cancelada pelos seguintes motivos:

- prazo excedido entre a coleta e o recebimento no Laboratório
- presença de desinfetante na amostra (percebido pelo odor, por exemplo)
- evidência de congelamento da amostra
- uso de frasco não-aprovado pelo laboratório
- volume insuficiente de amostra (por exemplo < 100mL)
- presença de contaminante que pode causar interferência (por exemplo metais pesados, detergentes, hidrocarbonetos, etc.)
- temperatura da amostra superior à temperatura máxima permitida

8.4 Registros analíticos: Registrar os resultados a tinta, e riscar quaisquer alterações de forma que o registro original permaneça visível. Datar e vistar essas alterações. Recomenda-se que as seguintes informações estejam a disposição imediata num resumo ou qualquer outro tipo de registro:

8.4.1 Identificação da amostra no laboratório

8.4.2 Data e hora do início da análise

8.4.3 Laboratório, assinatura ou iniciais da pessoa que realiza a análise

8.4.4 Técnica ou método analítico utilizado

8.4.5 Todos os itens de **CQ**

8.4.6 Resultados das análises

8.5 Manutenção preventiva

Recomenda-se que os laboratórios tenham registros de manutenção preventiva e de reparos efetuados em instrumentos e equipamentos (incluindo medidores de pH, balanças analíticas, incubadoras, refrigeradores, autoclaves e banhos-maria). Recomenda-se que esses registros sejam mantidos por cinco anos e estejam facilmente disponíveis para inspeção.

9 Ações de respostas a resultados laboratoriais

9.1 Culturas positivas para coliformes totais

Segundo a “Total Coliform Rule”, os laboratórios devem testar todas as amostras positivas para coliformes totais quanto à presença de coliformes fecais ou *E.coli*.

9.2 Notificação de resultados positivos

9.2.1 Segundo a “Total Coliform Rule”, os laboratórios devem notificar de imediato a autoridade competente a ocorrência de uma amostra positiva para coliformes totais, fecais ou *E.coli*, para que as providências adequadas possam ser tomadas (por exemplo coleta de amostras) (conforme citado em 40 CFR 141.21 (b) e (c), 141.31 etc.)

9.2.2 Se alguma amostra for positiva para coliformes fecais ou *E.coli*, “o sistema deve notificar o Estado ao final do dia, quando o sistema é notificado, a menos que o sistema tenha sido notificado do resultado após o encerramento do expediente no escritório do Estado, e nesse caso, o sistema deve notificar o Estado antes do final do próximo dia útil” (40 CFR 141.21 (e) (1)).

9.2.3 Um resultado positivo para coliformes totais baseia-se na etapa confirmativa da Técnica de Tubos Múltiplos ou no Teste Presença-Ausência para coliformes, ou no teste de verificação da Técnica de Membrana Filtrante se o meio M-Endo ou ágar Endo LES for usado. Não existem exigências para confirmar um resultados positivo para coliformes totais quando são empregados os testes Colilert, Colisure, ágar MI, E*Colite, mColiBlue24, Chromocult, Readycult/Fluorocult, Coliscan ou Colitag. Não existem igualmente exigências para confirmar resultados positivos para coliformes fecais ou *E.coli*. Em raros casos, nos quais uma cultura presuntiva positiva para coliformes totais não se confirma como tal, mas é verificada positiva para coliformes fecais ou *E.coli*, a amostra é considerada positiva para coliformes totais e fecais ou *E.coli*.

9.3 Notificação de interferência nos coliformes totais

Segundo a “Total Coliform Rule”, o laboratório deve notificar imediatamente a autoridade competente (em geral, o sistema de água) quando os resultados indicarem que bactérias não-coliformes podem ter interferido na análise de coliformes totais, conforme citado em 40 CFR 141.21 (c) (2).

Appendix G

Analytical Methods for Microbiology

Note: Information in brackets is not yet included in the Code of Federal Regulations

1. Total Coliform Rule (40 CFR 141.21(f))

(f) *Analytical methodology.*

(1) The standard sample volume required for total coliform analysis, regardless of analytical method used, is 100 mL.

(2) Public water systems need only determine the presence or absence of total coliforms; a determination of total coliform density is not required.

(3) Public water systems must conduct total coliform analyses in accordance with one of the analytical methods in the following table.

Organisms	Methodology ¹²	Citation ¹
Total Coliforms ²	Total Coliform Fermentation Technique ^{3,4,5}	9221 A, B
	Total Coliform Membrane Filter Technique ⁶	9222 A, B, C
	Presence-Absence (P-A) Coliform Test ^{5,7}	9221 D
	ONPG-MUG Test ⁸	9223
	Colisure Test ⁹	
	E*Colite [®] Test ¹⁰	
	m-ColiBlue24 [®] Test ¹¹	
	Readycult [®] Coliforms 100 ¹³	
	Membrane Filter Technique using Chromocult [®] Coliform Agar ¹⁴	
	Colitag Test ¹⁵	

The procedures shall be done in accordance with the documents listed below. The incorporation by reference of the following documents listed in footnotes 1, 6, 8, 9, 10, 11, 13 and 14 was approved by the Director of the Federal Register in accordance with 5 U.S.C. 552(a) and 1 CFR Part 51. Copies of the documents may be obtained from the sources listed below. Information regarding obtaining these documents can be obtained from the Safe Drinking Water Hotline at 800-426-4791. Documents may be inspected at EPA's Drinking Water Docket, 1301 Constitution Avenue, NW., EPA West, Room B102, Washington, DC 20460 (Telephone 202-566-2426) or at the Office of Federal Register, 800 North Capitol Street, NW, Suite 700, Washington, DC 20408.

¹ *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* , 18th edition (1992), 19th edition (1995), or 20th edition (1998). American Public Health Association, 1015 Fifteenth Street NW, Washington, D.C. 20005. The cited methods published in any of these three editions may be used.

² The time from sample collection to initiation of analysis may not exceed 30 hours. Systems are encouraged but not required to hold samples below 10 deg. C during transit.

³ Lactose broth, as commercially available, may be used in lieu of lauryl tryptose broth, if the system conducts at least 25 parallel tests between this medium and lauryl tryptose broth using the water normally tested, and this comparison demonstrates that the false-positive rate and false-negative rate for total coliform[s], using lactose broth, is less than 10 percent.

⁴ If inverted tubes are used to detect gas production, the media should cover these tubes at least one-half to two-thirds after the sample is added.

⁵ No requirement exists to run the completed phase on 10 percent of all total coliform-positive confirmed tubes.

⁶ MI agar also may be used. Preparation and use of MI agar is set forth in the article, "New medium for the simultaneous detection of total coliform[s] and *Escherichia coli* in water" by Brenner, K.P., et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59:3534-3544. Also available from the Office of Water Resource Center (RC-4100T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20460, EPA/600/J-99/225. Verification of colonies is not required.

⁷ Six-times formulation strength may be used if the medium is filter-sterilized rather than autoclaved.

⁸ The ONPG-MUG Test is also known as the Autoanalysis Colilert System.

⁹ A description of the Colisure Test, Feb 28, 1994, may be obtained from IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092. The Colisure Test may be read after an incubation time of 24 hours.

¹⁰ A description of the E*Colite® Test, "Presence/Absence for Coliforms and *E. coli* in Water," Dec 21, 1997, is available from Charm Sciences, Inc., 36 Franklin Street, Malden, MA 02148-4120.

¹¹ A description of the m-ColiBlue24® Test, Aug 17, 1999, is available from the Hach Company, 100 Dayton Avenue, Ames, IA 50010.

¹² EPA strongly recommends that laboratories evaluate the false-positive and negative rates for the method(s) they use for monitoring total coliforms. EPA also encourages laboratories to establish false-positive and false-negative rates within their own laboratory and sample matrix (drinking water or source water) with the intent that if the method they choose has an unacceptable false-positive or negative rate, another method can be used. The Agency suggests that laboratories perform these studies on a minimum of 5% of all total coliform-positive samples, except for those methods where verification/confirmation is already required, e.g., the M-Endo and LES Endo Membrane Filter Tests, Standard Total Coliform Fermentation Technique, and Presence-Absence Coliform Test. Methods for establishing false-positive and negative-rates may be based on lactose fermentation, the rapid test for β -galactosidase and cytochrome oxidase, multi-test identification systems, or equivalent confirmation tests. False-positive and false-negative information is often available in published studies and/or from the manufacturer(s).

¹³ The Readycult® Coliforms 100 Presence/Absence Test is described in the document, "Readycult® Coliforms 100 Presence/Absence Test for Detection and Identification of Coliform Bacteria and *Escherichia coli* in Finished Waters," (November 2000, Version 1.0) and is available from EM Science [now EMD Chemicals, Inc.], an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt Germany), 480 S. Democrat Road, Gibbstown, NJ 08027-1297. Telephone number is (800) 222-0342, E-Mail address is: adellenbusch@emscience.com [E-Mail address is now adellenbusch@emdchemicals.com. Website is www.emdchemicals.com]

¹⁴ Membrane Filter Technique using Chromocult® Coliform Agar is described in the document, "Chromocult® Coliform Agar Presence/Absence Membrane Filter Test Method for Identification of Coliform Bacteria and *Escherichia coli* in Finished Waters," November 2000, Version 1.0, available from EM Science [now EMD Chemicals, Inc.] (an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt Germany), 480 S. Democrat Road, Gibbstown, NJ 08027-1297. Telephone number is (800) 222-0342, E-Mail address is: adellenbusch@emscience.com [E-Mail address is now adellenbusch@emdchemicals.com. Website is www.emdchemicals.com]

¹⁵ Colitag® product for the determination of the presence/absence of total coliforms and *E. coli* is described in "Colitag® Product as a Test for Detection and Identification of Coliforms and *E. coli* Bacteria in Drinking Water and Source Water as Required in National Primary Drinking Water Regulations," August 2001, available from CPI International, Inc., 5580 Skylane Blvd., Santa Rosa, CA, 95403, telephone (800) 878-7654, Fax (707) 545-7901, Internet address <http://www.cpiinternational.com>.

(4) [Reserved]

(5) Public water systems must conduct fecal coliform analysis in accordance with the following procedure. When the MTF Technique or Presence-Absence (PA) Coliform Test is used to test for total coliforms, shake the lactose-positive presumptive tube or P-A vigorously and transfer the growth with a sterile 3-mm loop or sterile applicator stick into brilliant green lactose bile broth and EC medium to determine the presence of total and fecal coliforms, respectively. For EPA-approved analytical methods which use a membrane filter, transfer the total coliform-positive culture by one of the following methods: remove the membrane containing the total coliform colonies from the substrate with a sterile forceps and carefully curl and insert the membrane into a tube of EC medium (the laboratory may first remove a small portion of selected colonies for verification), swab the entire membrane filter surface with a sterile cotton swab and transfer the inoculum to EC medium (do not leave the cotton swab in the EC medium), or inoculate individual total coliform-positive colonies into EC Medium. Gently shake the inoculated tubes of EC medium to insure adequate mixing and incubate in a waterbath at $44.5 \pm 0.2^\circ \text{C}$ for 24 ± 2 hours. Gas production of any amount in the inner fermentation tube of the EC medium indicates a positive fecal coliform test. The preparation of EC medium is described in Method 9221E (paragraph 1a) in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition (1992), 19th edition (1995), and 20th edition (1998); the cited method in any one of these three editions may be used. Public water systems need only determine the presence or absence of fecal coliforms; a determination of fecal coliform density is not required.

(6) Public water systems must conduct analysis of *Escherichia coli* in accordance with one of the following analytical

methods:

(i) EC medium supplemented with 50 µg/mL of 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) (final concentration), as described in Method 9222G in Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th edition (1995) and 20th edition (1998). Either edition may be used. Alternatively, the 18th edition (1992) may be used if at least 10 mL of EC medium, as described in paragraph (f)(5) of this section, is supplemented with 50 µg/mL of MUG before autoclaving. The inner inverted fermentation tube may be omitted. If the 18th edition is used, apply the procedure in paragraph (f)(5) of this section for transferring a total coliform-positive culture to EC medium supplemented with MUG, incubate the tube at $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ for 24 ± 2 hours, and then observe fluorescence with an ultraviolet light (366 nm) in the dark. If fluorescence is visible, *E. coli* are present.

(ii) Nutrient agar supplemented with 100 µg/mL 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) (final concentration), as described in Method 9222G in Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th edition (1995) and 20th edition (1998). Either edition may be used for determining if a total coliform-positive sample, as determined by a membrane filter technique, contains *E. coli*. Alternatively, the 18th edition (1992) may be used if the membrane filter containing a total coliform-positive colony(ies) is transferred to nutrient agar, as described in Method 9221B (paragraph 3) of Standard Methods (18th edition), supplemented with 100 µg/mL of MUG. If the 18th edition is used, incubate the agar plate at 35°C for 4 hours and then observe the colony(ies) under ultraviolet light (366 nm) in the dark for fluorescence. If fluorescence is visible, *E. coli* are present.

(iii) Minimal Medium ONPG-MUG (MMO-MUG) Test, as set forth in the article "National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with Presence-Absence Techniques" (Edberg et al.), Applied and Environmental Microbiology, Volume 55, pp. 1003-1008, April 1989. (Note: The Autoanalysis Colilert System is an MMO-MUG test). If the MMO-MUG test is total coliform-positive after a 24-hour incubation, test the medium for fluorescence with a 366-nm ultraviolet light (preferably with a 6-watt lamp) in the dark. If fluorescence is observed, the sample is *E. coli*-positive. If fluorescence is questionable (cannot be definitively read) after 24 hours incubation, incubate the culture for an additional four hours (but not to exceed 28 hours total), and again test the medium for fluorescence. The MMO-MUG Test with hepes buffer in lieu of phosphate buffer is the only approved formulation for the detection of *E. coli*.

(iv) The Colisure Test. A description of the Colisure Test may be obtained from the Millipore Corporation, Technical Services Department, 80 Ashby Road, Bedford, MA 01730. [Note: Manufacturer is now IDEXX Laboratories. See footnote 9 to the table in paragraph (f)(3) of this section.]

(v) The membrane filter method with MI agar, a description of which is cited in footnote 6 to the table in paragraph (f)(3) of this section.

(vi) E*Colite[®] Test, a description of which is cited in footnote 10 to the table at paragraph (f)(3) of this section.

(vii) m-ColiBlue24[®] Test, a description of which is cited in footnote 11 to the table in paragraph (f)(3) of this section.

(viii) ReadyCult[®] Coliforms 100 Presence/Absence Test, a description of which is cited in footnote 13 to the table at paragraph (f)(3) of this section.

(ix) Membrane Filter Technique using Chromocult[®] Coliform Agar, a description of which is cited in footnote 14 to the table at paragraph (f)(3) of this section.

(7) As an option to paragraph (f)(6)(iii) of this section, a system with a total coliform-positive, MUG-negative, MMO-MUG test may further analyze the culture for the presence of *E. coli* by transferring a 0.1 mL, 28-hour MMO-MUG culture to EC Medium + MUG with a pipet. The formulation and incubation conditions of EC Medium + MUG, and observation of the results are described in paragraph (f)(6)(i) of this section.

(8) The following materials are incorporated by reference in this section with the approval of the Director of the Federal Register in accordance with 5 U.S.C. 552(a) and 1 CFR part 51. Copies of the analytical methods cited in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (18th, 19th, and 20th editions) may be obtained from the American Public Health Association et al.; 1015 Fifteenth Street NW., Washington, DC 200052605. Copies of the MMO-MUG Test as set forth in the article "National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method" (Edberg et al.) may be obtained from the American Water Works Association Research Foundation, 6666 West Quincy Avenue, Denver, CO 80235. A description of the Colisure Test may be obtained from the Millipore Corp., Technical Services Department, 80 Ashby Road, Bedford, MA 01730 [Note: Now a description of the Colisure Test may now be obtained from IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092.]. Copies may be inspected at EPA's Drinking Water Docket; 401 M St., SW.; Washington, DC 20460 [Note: current location of EPA's Drinking Water Docket is 1301 Constitution Avenue, NW., EPA West, Room B 102, Washington, DC 20460], or at the Office of the Federal Register; 800 North Capitol Street, NW., Suite 700, Washington, DC.

2. Surface Water Treatment Rule (40 CFR 141.74(a))

(a) *Analytical requirements* . Only the analytical method(s) specified in this paragraph, or otherwise approved by EPA, may be used to demonstrate compliance with §§141.71, 141.72 and 141.73. Measurements for pH, turbidity, temperature and residual disinfectant

concentrations must be conducted by a person approved by the State. Measurement for total coliforms, fecal coliforms and HPC must be conducted by a laboratory certified by the State or EPA to do such analysis. Until laboratory certification criteria are developed for the

analysis of fecal coliforms and HPC, any laboratory certified for total coliforms analysis by the State or EPA is deemed certified for fecal coliforms and HPC analysis. The following procedures shall be conducted in accordance with the publications listed in the following section.

This incorporation by reference was approved by the Director of the Federal Register in accordance with 5 U.S.C. 552(a) and 1 CFR part 51. Copies of the methods published in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* may be obtained from the American Public Health Association et al., 1015 Fifteenth Street, NW., Washington, DC 20005; copies of the Minimal Medium ONPG-MUG Method as set forth in the article "National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method" (Edberg et al.), *Applied and Environmental Microbiology*, Volume

54, pp. 1595-1601, June 1988 (as amended under Erratum, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 54, p. 3197, December, 1988), may be obtained from the American Water Works Association Research Foundation, 6666 West Quincy Avenue, Denver, Colorado, 80235; and copies of the Indigo Method as set forth in the article "Determination of Ozone in Water by the Indigo Method" (Bader and Hoigne), may be obtained from Ozone Science & Engineering, Pergamon Press Ltd., Fairview Park, Elmsford, New York 10523. Copies may be inspected at the U.S. Environmental Protection Agency, Room EB15, 401 M St., SW., Washington, DC 20460 [Note: current location of EPA's Drinking Water Docket is 1301 Constitution Avenue, NW., EPA West, Room B102, Washington, DC 20460;] or at the Office of the Federal Register, 800 North Capitol Street, NW., suite 700, Washington, DC.

(1) Public water systems must conduct analysis of pH and temperature in accordance with one of the methods listed at §141.23(k)(1). Public water systems must conduct analysis of total coliforms, fecal coliforms, heterotrophic bacteria, and turbidity in accordance with one of the following analytical methods and by using analytical test procedures contained in *Technical Notes on Drinking Water Methods*, EPA-600/R-94-173, October 1994, which is available at NTIS PB95-104766.

Organism	Methodology	Citation ¹
Total Coliform ²	Total Coliform Fermentation Technique ^{3,4,5} Total Coliform Membrane Filter Technique ⁶ ONPG-MUG Test ⁷	9221 A. B. C 9222 A, B, C 9223
Fecal Coliforms..... ²	Fecal Coliform Procedure ⁸ Fecal Coliform Filter Procedure	9221 E 9222 D
Heterotrophic bacteria ² ..	Pour Plate Method SimPlate ¹¹	9215 B
Turbidity	Nephelometric Method Nephelometric Method Great Lakes Instruments Hach FilterTrak	2130 B 180.1 ⁹ Method 2 ¹⁰ 10133 ¹²

The procedures shall be done in accordance with the documents listed below. The incorporation by reference of the following documents listed in footnotes 1, 6, 7, 9-12 was approved by the Director of the Federal Register in accordance with 5 U.S.C. 552(a) and 1 CFR part 51. Copies of the documents may be obtained from the sources listed below. Information regarding obtaining these documents can be obtained from the Safe Drinking Water Hotline at 800-426-4791. Documents may be inspected at EPA's Drinking Water Docket, 1301 Constitution Avenue, NW., EPA West, Room B102, Washington, DC 20460 (Telephone: 202-566-2426); or at the Office of the Federal Register, 800 North Capitol Street, NW, Suite 700, Washington, D.C. 20408.

¹ Except where noted, all methods refer to *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition (1992), 19th edition (1995), or 20th edition (1998), American Public Health Association, 1015 Fifteenth Street, NW, Washington, D.C. 20005. The cited methods published in any of these three editions may be used.

² The time from sample collection to initiation of analysis may not exceed 8 hours. Systems must hold samples below 10 deg. C during transit.

³ Lactose broth, as commercially available, may be used in lieu of lauryl tryptose broth, if the system conducts at least 25 parallel tests between this medium and lauryl tryptose broth using the water normally tested, and this comparison demonstrates that the false-positive rate and false-negative rate for total coliform, using lactose broth, is less than 10 percent.

⁴ Media should cover inverted tubes at least one-half to two-thirds after the sample is added.

⁵ No requirement exists to run the completed phase on 10 percent of all total coliform-positive confirmed tubes.

⁶ MI agar also may be used. Preparation and use of MI agar is set forth in the article, "New medium for the simultaneous detection of total coliform[s] and *Escherichia coli* in water" by Brenner, K.P., et al., 1993, Appl. Environ. Microbiol. 59:3534-3544. Also available from the Office of Water Resource Center (RC-4100T), 1200 Pennsylvania Ave., NW, Washington, DC 20460, EPA 600/J-99/225. Verification of colonies is not required.

⁷ The ONPG-MUG Test is also known as the Autoanalysis Colilert System.

⁸ A-1 Broth may be held up to three months in a tightly closed screw cap tube at 4 deg. C.

⁹ "Methods for the Determination of Inorganic Substances in Environmental Samples", EPA/600/R-93/100, August 1993. Available at NTIS, PB94-121811.

¹⁰ GLI Method 2, "Turbidity", November 2, 1992, Great Lakes Instruments, Inc., 8855 North 55th Street, Milwaukee, Wisconsin 53223.

¹¹ A description of the SimPlate method, "IDEXX SimPlate TM HPC Test Method for Heterotrophs in Water", November 2000, can be obtained from IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, telephone (800) 321-0207.

¹² A description of the Hach FilterTrak Method 10133, "Determination of Turbidity by Laser Nephelometry", January 2000, Revision 2.0, can be obtained from Hach Co., P.O. Box 389, Loveland, Colorado 80539-0389. Phone: 800-227-4224.

3. Ground Water Rule (to be added after rule promulgation)

REFERÊNCIAS

50

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18^a ed. Washington: APHA:AWWA: WEF,1992.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19^a ed. Washington: APHA:AWWA: WEF,1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: APHA:AWWA: WEF,1998.

ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS: Title 40 - Protection of Environment. Chapter I--Environmental Protection Agency Subchapter D--Water Programs - Part 141 - National Primary drinking water regulations - Subpart C Monitoring and Analytical Requirements. §141.21. Coliform sampling. 27 fevereiro 2007. Disponível em: <http://www.gpoaccess.gov/ecfr/>>. Acesso em: 12 jul. 2007.

ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS: Title 40 - Protection of Environment. Chapter I--Environmental Protection Agency Subchapter D--Water Programs - Part 141 - National Primary drinking water regulations -141.70 a 141.76 (Subpart H) Filtration and Disinfection. 27 fevereiro 2007. Disponível em: <http://www.gpoaccess.gov/ecfr/>>. Acesso em: 12 jul. 2007.

ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS: Title 40 - Protection of Environment. Chapter I--Environmental Protection Agency Subchapter D--Water Programs - Part 141 - National Primary drinking water regulations – 141.400 a 141.405 (Subpart S) Ground Water Rule. .27 de julho 2007. Disponível em: <http://www.gpoaccess.gov/ecfr/>>. Acesso em: 12 jul. 2007.

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Informações gerais da auditoria

Laboratório:
Endereço para correspondência (endereço para correspondência do proprietário, se for diferente):
Rua:
Cidade, Estado, CEP:
Local da Auditoria (se for diferente):
Telefone:
FAX:
E-mail:
Outras informações:
Organização responsável pela auditoria:
Assinaturas dos auditores
Data da auditoria:

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

52

Informações sobre o pessoal do Laboratório

Cargo/Título	Nome	Grau de instrução máximo	Treinamento especializado	Área de especialização atual	Experiência e nº de anos no cargo atual
Supervisor do Laboratório					
Consultor do Laboratório					
Analista principal					
Analista 2					
Analista 3					
Analista 4					
Outros					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
1. PESSOAL					
Supervisor/Consultor	1.1				
O supervisor é bacharel em Microbiologia Biologia, ou em curso equivalente?					
O supervisor do Laboratório tem formação diferente daquelas relacionadas acima, ou tem pelo menos curso superior prático de Microbiologia que tenha incluído a área de Microbiologia Ambiental?					
Além disso, o supervisor tem treinamento mínimo de duas semanas em Agência Federal, Estadual, ou instituição acadêmica, sobre análises microbiológicas de água de consumo humano, ou 80 horas de experiência (com vínculo empregatício) em laboratório certificado (microbiologia da água), ou outro treinamento aceito pelo Estado ou pela EPA?					
Se não houver supervisor, e não tiver sido concedida dispensa dessa exigência conforme determinado na seção 1.3, existe um consultor com as mesmas qualificações para substituí-lo?					
Está documentado pelo Laboratório que o consultor é considerado aceitável pelo Estado, e que ele está presente no Laboratório com a frequência necessária para desempenhar satisfatoriamente as funções de supervisor?					
O supervisor do Laboratório pode comprovar que todo o pessoal tem capacidade para executar satisfatoriamente as análises a eles atribuídas?					
O supervisor do Laboratório pode comprovar que todos os dados relatados pelo laboratório atendem à garantia de qualidade e aos critérios reguladores requeridos?					
Analista (ou cargo equivalente)	1.2				
O analista tem o 2º grau completo, experiência de bancada mínima de três meses em microbiologia da água, leite ou alimentos, treinamento em análises microbiológicas de água de consumo humano considerado aceitável pelo Estado (ou EPA), e um mínimo de 30 dias de experiência (com vínculo empregatício) sob a supervisão de um analista experiente?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
O analista pode obter resultados aceitáveis com amostras desconhecidas antes de analisar amostras para atendimento a padrões de qualidade?					
Dispensa de treinamento acadêmico	1.3				
O auditor dispensou o treinamento acadêmico conforme especificado acima para analistas muito experientes do Laboratório?					
O auditor dispensou o treinamento acima especificado para laboratórios de sistemas de água para consumo humano que analisam apenas amostras provenientes daquele sistema?					
Se uma das duas respostas acima for positiva, o Laboratório tem disponível para inspeção uma cópia escrita e assinada da dispensa?					
Registros pessoais	1.4				
O Laboratório mantém registros pessoais dos analistas incluindo formação acadêmica, cursos especializados e tipos de análises microbiológicas realizadas?					
2. INSTALAÇÕES DO LABORATÓRIO					
O Laboratório tem instalações com controle de temperatura, umidade e iluminação adequada para as bancadas?					
O Laboratório possui uma separação efetiva entre áreas incompatíveis?					
O Laboratório controla o acesso, onde for adequado, e minimiza o fluxo de pessoas na área de trabalho?					
O Laboratório garante que a contaminação não influi negativamente na qualidade dos resultados?					
O Laboratório tem bancadas e pisos de fácil limpeza e desinfecção?					
O Laboratório tem espaço suficiente para processar amostras; espaço para armazenamento de meios, vidrarias e equipamentos portáteis; espaço adequado para equipamentos de piso; e áreas para lavagem de vidraria e esterilização de materiais?					
O Laboratório tem procedimentos para descarte de resíduos microbiológicos?					
3. EQUIPAMENTOS E SUPRIMENTOS					
O Laboratório tem os equipamentos e suprimentos necessários para executar os métodos aprovados para os quais a certificação está sendo solicitada?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Medidor de pH	3.1				
A precisão e a graduação da escala são de $\pm 0,1$ unidade?	3.1.1				
As alíquotas do tampão são utilizadas apenas uma vez?	3.1.2				
Os eletrodos são mantidos de acordo com as instruções do fabricante?	3.1.3				
CQ Os medidores de pH são calibrados antes de cada período de uso com tampões padrão de pH 7,0, e 4,0 ou 10,0, conforme o pH do meio ou reagente em preparação?	3.1.4				
CQ A data e os tampões utilizados são registrados no “logbook” do equipamento juntamente com as iniciais do analista?					
CQ A inclinação (“slope”) do pH é registrada mensalmente após cada calibração?	3.1.5				
CQ Se o medidor de pH não calcular automaticamente a curva, mas pode fornecer o pH em milivolts, a fórmula da seção 3.1.5.1 é utilizada para calcular a inclinação?	3.1.5.1				
CQ Se a inclinação estiver abaixo de 95% ou acima de 105%, são seguidas as instruções do fabricante para manutenção geral e limpeza do aparelho ou dos eletrodos?	3.1.5.2				
CQ As soluções tampão comercializadas são datadas quando recebidas e quando abertas?	3.1.6				
CQ As soluções tampão são descartadas na data de vencimento?					
Balança de topo ou prato	3.2				
A balança tem uma leitura de 0,1 g?	3.2.1				
A balança tem sensibilidade de pelo menos 0,1 g para uma carga de 150g e de 1mg para uma carga menor ou igual a 10g?	3.2.2				
CQ As balanças são calibradas mensalmente com pesos Classe 1, 2, ou 3 ASTM (no mínimo 3 pesos rastreáveis que compreendam as faixas de peso utilizadas no laboratório, com leitura de 0,1g)?	3.2.3				
CQ Os pesos que não são de referência são calibrados a cada 6 meses contra pesos de referência?					
CQ As calibrações são registradas no “logbook” do equipamento juntamente com as iniciais do analista?					
CQ Os fatores de correção estão disponíveis e são utilizados?					
CQ Os pesos de referência são certificados novamente a cada 5 anos?					
CQ Os pesos danificados ou corroídos são substituídos?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ São disponíveis protocolos para manutenção interna ou contratos de serviços e registros das manutenções?	3.2.4				
CQ A manutenção, calibração e limpeza são realizadas pelo menos anualmente por um técnico qualificado independente, a menos que o auditor tenha modificado ou eliminado esse requisito?					
Instrumentos para controle da temperatura	3.3				
Os termômetros de vidro, analógicos e eletrônicos são graduados em incrementos de 0,5°C (incrementos de 0,2°C para testes com temperatura de incubação a 44,5°C) ou menos, exceto conforme especificado para estufas de secagem e esterilização (seção 3.6.1) e geladeiras (3.9.1)?	3.3.1				
A observação dos termômetros de vidro não indica separação na coluna de fluidos?					
Somente são utilizados termômetros analógicos que podem ser ajustados?					
CQ Os termômetros de vidro e eletrônicos são calibrados anualmente e os analógicos quatro vezes ao ano, com um termômetro de referência rastreável ao NIST ou com outro que atenda aos requisitos da Monografia NBS SP 250-23?	3.3.2				
CQ O fator e a data de calibração estão indicados no termômetro?					
CQ As seguintes informações sobre a calibração estão registradas: - Número de série do termômetro; - Número de série do termômetro de referência rastreável ao NIST (ou a outro termômetro de referência); - Temperatura do termômetro do laboratório; - Temperatura do termômetro de referência rastreável ao NIST (ou a outro termômetro de referência); - Fator de correção (ou de calibração); - Dia da verificação; - Iniciais do analista.					
CQ O termômetro é descartado se diferir em mais de 1°C do termômetro de referência?	3.3.3				
CQ Os termômetros de referência são calibrados a cada cinco anos pelo menos?					
CQ A documentação sobre a calibração do termômetro de referência é mantida?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Os instrumentos de registro contínuo utilizados para controlar a temperatura de incubadoras são calibrados novamente, a cada ano pelo menos, com um termômetro de referência que atenda às especificações do item 3.3.2?	3.3.4				
Incubadora	3.4				
As incubadoras têm um dispositivo interno para controle da temperatura e mantém a temperatura especificada no método utilizado, em geral $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}$?	3.4.1				
Para incubadoras de piso, os termômetros são colocados nas prateleiras superiores e inferiores com o bulbo imerso em líquido, conforme determinado pelo fabricante (exceto para termômetros eletrônicos)?					
Quando incubadoras de bloco de alumínio são utilizadas, os tubos e placas adaptam-se perfeitamente?					
CQ A temperatura corrigida conforme a calibração é registrada para cada termômetro, pelo menos duas vezes ao dia, nos dias em que a incubadora está em uso?	3.4.2				
CQ Essas leituras são realizadas com intervalos de 4 horas pelo menos?					
CQ Os registros dessas leituras incluem data e hora, temperatura e iniciais do técnico?					
Se um banho com circulação de água é utilizado, ele dispõe de uma tampa para manter a temperatura de $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}$?					
Autoclave	3.5				
A autoclave tem uma fonte interna de calor, uma sonda de temperatura com sensor na exaustão, um sonda de pressão e uma válvula operacional de segurança?	3.5.1				
A autoclave pode manter uma temperatura de esterilização durante o ciclo de esterilização e completar um ciclo total em 45 minutos, quando o período de esterilização é de 12-15 minutos?					
A autoclave despressuriza-se lentamente de forma que o meio não ferva e que não se formem bolhas nos tubos invertidos?					
CQ As seguintes informações são registradas a cada uso da autoclave? - Data - Conteúdo - Tempo e temperatura de esterilização - Tempo total na autoclave - Iniciais do analista	3.5.3				

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Estão disponíveis cópias dos protocolos de manutenção interna ou contratos de serviço e dos registros de manutenção?					
CQ A manutenção é realizada pelo menos anualmente?					
CQ O registro da manutenção mais recente está disponível para inspeção?					
CQ É utilizado um termômetro de máxima, registro eletrônico de temperatura ou dispositivo contínuo de registro em cada ciclo da autoclave para garantir que a temperatura adequada foi atingida?	3.5.4				
CQ A temperatura é registrada?					
CQ A sobrecarga da autoclave é evitada?					
CQ São utilizadas mensalmente fitas ou ampolas contendo esporos, como bioindicadores para confirmar a esterilização?					
CQ Os mecanismos automáticos de controle do tempo são verificados quatro vezes ao ano com um cronômetro ou outro instrumento exato de controle de tempo, e os resultados são registrados e as correções necessárias implantadas?	3.5.5				
As portas da autoclave estão limpas, sem resíduos de meio de cultura?	3.5.6				
Os ralos dos drenos da autoclave são limpos e os resíduos são removidos com frequência?					
Estufa de secagem e esterilização	3.6				
A estufa de secagem e esterilização mantém uma temperatura estável de 170°-180°C durante pelo menos 2 horas?	3.6.1				
A sobrecarga é evitada?					
O termômetro do forno é graduado em incrementos de 10°C ou menos, e o bulbo colocado em areia durante o uso?					
CQ As seguintes informações são registradas a cada ciclo? - Data - Conteúdo - Tempo e temperatura de esterilização - Iniciais do analista	3.6.2				
CQ São utilizadas mensalmente fitas contendo esporos para confirmar a esterilização?	3.6.3				
Contador de colônias	3.7				
É utilizado um contador de campo escuro para contar colônias na técnica de contagem de bactérias heterotróficas?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Condutivímetro	3.8				
O equipamento é adequado para verificação da água purificada e a leitura é feita em micromhos/cm ou microsiemens/cm?	3.8.1				
CQ O equipamento é calibrado pelo menos mensalmente, seguindo as instruções do fabricante e com a utilização de um padrão certificado, rastreável e de condutividade baixa?	3.8.2				
CQ Se o equipamento não pode ser calibrado conforme especificado acima, a constante da célula é determinada mensalmente, utilizando-se o método descrito no “Standard Methods”, seção 2.5.10?					
É utilizada para verificação da água purificada uma unidade “on line” que não pode ser calibrada?	3.8.3				
Geladeira	3.9				
A geladeira mantém temperatura de 1°-5°C?	3.9.1				
O termômetro da geladeira é graduado em incrementos de pelo menos 1°C e o bulbo está imerso em líquido?					
CQ Quando a geladeira está em uso e o pessoal do laboratório presente, a temperatura corrigida pela calibração é registrada pelo menos uma vez ao dia?	3.9.2				
Instrumentos para inoculação	3.10				
São utilizadas alças de metal ou de plástico (descartáveis) estéreis, palitos de madeira, “swabs” ou ponteiras descartáveis estéreis?					
Os palitos de madeira, se utilizados, são esterilizados por calor seco?					
As alças de inoculação e agulhas metálicas são de liga níquel-cromo ou de platina?					
Equipamento de Membrana Filtrante	3.11				
Os funis são de aço inoxidável, vidro, porcelana ou plástico autoclavável?	3.11.1				
Os funis estão riscados, corroídos ou apresentam vazamentos?					
CQ Se as marcas de graduação nos funis de vidro ou plástico são utilizadas para medir o volume da amostra, sua exatidão é verificada com provetas graduadas classe B ou superior (ou outra vidraria classe B) e um registro dessa verificação é mantido?	3.11.2				
É utilizado um microscópio estereoscópico com aumento de 10x-15x, com fonte de luz fluorescente para contagem de colônias com brilho metálico?	3.11.3				

LISTA DE VERIFICAÇÃO - MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
As membranas filtrantes são aprovadas pelo fabricante para análise de coliformes totais ?	3.11.4				
As membranas filtrantes são de éster de celulose, quadriculadas, de 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade?					
Na utilização de porosidade diferente, o fabricante fornece dados referentes ao desempenho igual ou superior ao da porosidade de 0,45µm?					
As membranas e discos absorventes são adquiridos pré-esterilizados ou são autoclavados durante 10 minutos a 121°C antes do uso?					
CQ O número do lote das membranas filtrantes e a data de recebimento são registrados?	3.11.5				
CQ As membranas são examinadas para verificar se não estão dobradas ou amassadas?					
CQ As especificações e o certificado do fabricante estão disponíveis?					
As pinças não apresentam superfície cortante e têm extremidades lisas e arredondadas?	3.11.6				
Placas de Petri (tampas herméticas e tampas frouxas)	3.12				
São utilizadas placas de Petri de plástico pré-esterilizadas ou de vidro esterilizáveis?	3.12.1				
A esterilidade das placas de vidro é mantida, pelo acondicionamento em recipientes de alumínio ou aço inoxidável, ou com papel alumínio espesso ou papel resistente ao calor?					
As placas de tampas frouxas são incubadas em recipiente hermeticamente fechado contendo papel toalha umedecido?	3.12.2				
Pacotes de placas descartáveis são mantidos fechados entre os períodos de uso?	3.12.3				
Nos métodos de membrana filtrante são utilizadas placas de tamanho adequado para conter apenas uma membrana?	3.12.4				
Pipetas	3.13				
As pipetas de vidro são esterilizadas e mantidas em recipientes de aço inoxidável ou alumínio, ou são embrulhadas individualmente em papel alumínio ou papel resistente ao calor?	3.13.1				
As pipetas têm marcas de graduação legíveis e não apresentam trincas ou quebras?	3.13.2				
Pacotes abertos de pipetas descartáveis são mantidos fechados entre os períodos de uso?	3.13.3				
As pipetas de 10mL ou de menor volume são exatas com tolerância de 2,5%?	3.13.4				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
São utilizados micropipetadores calibrados com ponteiros estéreis?	3.13.5				
Os micropipetadores são calibrados anualmente e ajustados ou substituídos se a precisão ou exatidão for maior que 2,5%?					
Vidraria e material de plástico	3.14				
A vidraria é feita de vidro borossilicato ou qualquer outro tipo de vidro resistente à corrosão, sem trincas e quebras?	3.14.1				
As marcas de graduação nas pipetas e provetas são legíveis?					
Os materiais de plástico são claros e não apresentam toxicidade para microrganismos?					
CQ As provetas ou outros recipientes pré-calibrados usados para medir o volume da amostra têm marcas de graduação nítidas, e são exatas com 2,5% de tolerância?	3.14.2				
Tubos de cultura e outros recipientes para meios fermentáveis são de tamanho suficiente para conter meio e amostra sem estar com mais de três quartos de sua capacidade completa?	3.14.3				
As tampas dos tubos de cultura são de aço inoxidável, plástico, alumínio, ou de rosca, com batoques não-tóxicos?	3.14.4				
São utilizadas tampas de algodão ou de espuma?					
Frascos de coleta	3.15				
Os frascos de coleta têm boca larga, são de plástico ou vidro não-corrosível, possuem tampas herméticas de vidro ou de plástico com batoques não-tóxicos? Ou são utilizados sacos plásticos estéreis contendo tiosulfato de sódio ou qualquer outro recipiente adequado?	3.15.1				
O frasco de coleta tem capacidade mínima de 120mL e ainda permite 2 cm de espaço livre?					
As tampas são cobertas com papel alumínio ou papel resistente ao calor para esterilização?	3.15.2				
Frascos plásticos são esterilizados na autoclave e frascos de vidro na estufa de esterilização e secagem?	3.15.3				
Recipientes vazios são umedecidos com gotas de água antes da autoclavagem?					
Se água clorada for analisada, o tiosulfato de sódio é adicionado aos frascos de coleta antes da esterilização em quantidade suficiente de neutralizar o cloro residual das amostras?	3.15.4				

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Lâmpada ultravioleta	3.16				
A unidade germicida é desconectada mensalmente e a lâmpada é limpa com pano macio umedecido com etanol?	3.16.1				
A unidade de comprimento de onda longo dos testes fluorométricos é mantida limpa?					
CQ A unidade germicida é testada quatro vezes ao ano com luxímetro ou pela técnica de inoculação em superfície?	3.16.2				
CQ A lâmpada é substituída se emitir menos que 70% da sua produção inicial ou se a placa de cultura contendo 200 a 250 microrganismos, exposta à luz UV por 2 minutos, não apresentar uma redução de 99% na contagem?					
Espectrofotômetro ou colorímetro	3.17				
Os comprimentos de onda são na faixa do visível?	3.17.1				
CQ O padrão de calibração e o branco do método são testados no dia em que o instrumento é utilizado, antes da análise das amostras?	3.17.2				
CQ O padrão de calibração é obtido de fontes externas?					
CQ O padrão de calibração apresenta leitura na faixa de absorbância desejada?					
4 – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS					
O pessoal do Laboratório tem conhecimento dos procedimentos gerais de segurança laboratorial?					
O Laboratório tem um plano de segurança?					
O Laboratório mantém cópias das fichas de informação sobre segurança de produtos químicos e segue as orientações para proteção pessoal?					
Procedimentos para esterilização	4.1				
O Laboratório segue os tempos mínimos para autoclavação dos materiais relacionados abaixo a 121°C?	4.1.1				
Membranas filtrantes e discos absorventes..10min Meios com carboidratos.....12-15min ¹ Materiais contaminados.....30min ² Funis.....15min Frascos de coleta.....15min Vidraria individual.....15min Água de diluição.....15min Água de enxágüe (0,5-1,0L).....15min					
¹ Salvo especificação contrária do fabricante. ² O tempo depende do volume de água do recipiente e da carga da autoclave.					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
As membranas filtrantes, discos absorventes e meios de cultura são removidos logo após o término do ciclo de autoclavagem?	4.1.2				
O equipamento da membrana filtrante é autoclavado antes das filtrações?	4.1.3				
Se a luz ultravioleta (254nm) é utilizada para “desinfetar” o equipamento após a autoclavagem para esterilização, todos os outros materiais são pré-esterilizados?	4.1.4				
Frascos de coleta	4.2				
CQ Pelo menos um frasco de coleta selecionado ao acaso de cada lote de frascos estéreis (ou do lote de recipientes já adquiridos estéreis) é testado quanto à esterilidade pela adição de 25mL de caldo não-seletivo estéril, incubação a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e verificação de crescimento após 24 e 48 horas?					
CQ Esses resultados são registrados?					
CQ Se ocorrer crescimento, o lote inteiro é esterilizado novamente?					
Água purificada	4.3				
O Laboratório utiliza para preparo de meios de cultura, reagentes e água de diluição, água purificada proveniente de deionizadores ou destiladores e que apresenta qualidade adequada?	4.3.1				
CQ A água purificada é testada e atende aos seguintes critérios de qualidade? Condutividade >0,5 megaohms resistividade Mensal* ou <2 micromhos/cm (microsiemens/cm) a 25°C Pb, Cd, Cr, < 0,05mg/L Anual Cu, Ni, Zn por contaminante. Em conjunto < 0,1mg/L Cloro total < 0,1mg/L Mensal residual* Contagem de <500 UFC/mL* Mensal bactérias heterotróficas* Qualidade Razão de taxa de Anual bacteriológica* de crescimento de 0,8 a 3,0 *ver seção notas de rodapé no item 4.3.2.	4.3.2				
Água de diluição/enxágue	4.4				
A solução tampão estoque ou água peptonada é preparada conforme especificado no “Standard Methods”, Seção 9050C?	4.4.1				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
As soluções tampão estoque são autoclavadas ou esterilizadas por filtração?	4.42				
Esses recipientes são rotulados, datados e mantidos na geladeira?					
As soluções tampão estoque não apresentam turbidez?					
CQ Cada lote de água de diluição ou enxágüe é verificado quanto à esterilidade pela adição de 50mL da água a 50mL de caldo duplo não-seletivo, incubação a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e observação da ocorrência de crescimento após 24 e 48 horas?	4.4.3				
CQ Esses resultados são registrados?					
CQ O lote é descartado se ocorrer crescimento?					
Lavagem da vidraria	4.5				
O enxágüe final é feito com água destilada ou deionizada?	4.5.1				
A vidraria é lavada com um detergente específico para laboratório?	4.5.2				
CQ O teste de resíduos inibidores é realizado sempre que um novo produto para lavagem é utilizado e sempre que o procedimento de lavagem é de alguma forma modificado?	4.5.3				
CQ Esses resultados são registrados?					
CQ Cada lote de vidraria lavada é verificado quanto à reação ao pH com solução de azul de bromotimol 0,04% (ou equivalente)?	4.5.4				
5. METODOLOGIA ANALÍTICA					
Generalidades	5.1				
Nas amostras analisadas para atendimento a padrões de qualidade o Laboratório usa somente as metodologias especificadas na “Total Coliform Rule” (TCR), na “Surface Water Treatment Rule” (SWTR) e na “Ground Water Rule” (GWR)?	5.1.1				
O Laboratório está certificado em todas as análises que ele realiza para atendimento à legislação?	5.1.2				
No mínimo, o Laboratório é certificado em um método para coliformes totais, coliformes fecais e <i>E. coli</i> ?					
O Laboratório é certificado para um segundo método para coliformes totais, se o primeiro método não pode ser utilizado para águas para consumo humano?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Se o Laboratório realiza contagem de bactérias heterotróficas para atendimento à SWTR, ele é certificado no método de inoculação em profundidade ou no “SimPlate”?					
Todas as amostras são agitadas vigorosamente 25 vezes antes da análise?	5.1.3				
CQ Para a água de diluição, o volume da água é verificado em um frasco de cada lote?	5.1.4				
CQ Para volumes de 90 ou 99mL a tolerância é de $\pm 2\text{mL}$?					
Para coliformes totais em águas de consumo humano é analisado um volume de 100mL?	5.1.5				
Meios (ou substrato definido)	5.1.6				
Os meios desidratados são armazenados em local frio e seco e descartados na data de validade?	5.1.6.1				
Meios com aspecto alterado são descartados?					
CQ Para meios preparados no laboratório, as seguintes informações são registradas? -Data do preparo -Tipo de meio -Número do lote -Tempo e temperatura de esterilização -pH final (após a esterilização) -Iniciais do analista	5.1.6.2				
CQ Para meios adquiridos prontos são registradas as seguintes informações para cada lote? -Data do recebimento -Tipo de meio -Número do lote -Verificação do pH	5.1.6.3				
CQ Os meios adquiridos prontos para uso são descartados na data de validade?					
CQ Cada novo lote de meio preparado no laboratório ou adquirido pronto para o uso é testado quanto à esterilidade e com culturas controle positivas e negativas?	5.1.6.4				
CQ Esses resultados são registrados?					
Os laboratórios que adquirem meios prontos, com validade maior que 90 dias, realizam testes com culturas controle positivas e negativas quatro vezes ao ano, adicionalmente aos testes citados acima?					
CQ Esses resultados são registrados?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ As culturas controle estoque são periodicamente verificadas quanto à pureza, ou são adquiridos discos impregnados com essas culturas?					
Os meios preparados são armazenados ao abrigo da luz, conforme abaixo: -placas prontas 1°-5°C 2 semanas -caldo em tubos 1°-30°C 2 semanas c/ tampas frouxas -caldo em tubos 1°-30°C 3 meses c/ tampas herméticas	5.1.6.5				
CQ O Laboratório compara novos métodos para coliformes totais com métodos aprovados pela EPA durante vários meses no mínimo e durante várias estações incluindo os vários tipos de água analisada? Recomendado.	5.1.7				
O Laboratório utiliza os métodos aprovados mencionados na TCR, SWTR e GWR?	5.1.8				
Métodos com meios líquidos baseados na fermentação da lactose	5.2				
Instruções Gerais	5.2.1				
O nível da água no banho-maria fica acima do nível superior dos meios em tubos?	5.2.1.1				
Se é utilizado um banho seco, a temperatura especificada é mantida em todos os orifícios para os tubos?	5.2.1.2				
<u>Técnica de tubos múltiplos</u> (para detecção de coliformes totais em água para consumo humano e quantificação de coliformes totais em águas brutas destinadas a captação)	5.2.2				
<u>Para águas para consumo humano</u> , é testado um volume de 100mL de amostra?	5.2.2.1				
<u>Para águas brutas destinadas a captação</u> , são utilizadas pelo menos 3 séries de 5 tubos com diluições apropriadas?	5.2.2.2				
Meios	5.2.2.3				
São utilizados o caldo lauril triptose (CLT) na etapa presuntiva e o caldo verde brilhante e bile 2% (CLVBB) na etapa confirmativa?	5.2.2.3.1				
Se é utilizado o caldo lactosado (CL) em vez do CLT, foram realizados 25 testes em paralelo com os dois meios e as águas normalmente analisadas?					
Essa comparação demonstrou que a taxa de falso-positivos e falso-negativos para coliformes totais, com CL é menor que 10%?					
Essa comparação foi documentada e os registros foram mantidos?					
O pH final do CLT é 6,8±0,2?					

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
O pH final do CLVBB é $7,2 \pm 0,2$?					
A concentração dos meios é ajustada para compensar o volume de amostra inoculado, de forma que após essa adição o meio esteja em concentração simples?	5.2.2.3.2				
Se é utilizado um volume único de amostra de 100mL, o tubo invertido é substituído pelo indicador púrpura de bromocresol?					
O meio é autoclavado a 121°C por 12-15 minutos?					
O meio já esterilizado nos tubos é examinado para verificar a presença de bolhas de ar nos tubos invertidos, e se pelo menos metade a dois terços dos mesmos serão cobertos pelo meio após a adição da amostra?	5.2.2.3.3				
O meio inoculado é incubado a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas?	5.2.2.4				
Se não for detectada acidez ou formação de gás, o meio inoculado é incubado por 24 horas adicionais?					
Cada tubo que apresentou acidez ou gás, nos períodos de 24 e 48 horas é submetido ao teste confirmativo com CLVBB?	5.2.2.5				
<u>Para amostras de águas de consumo humano</u> , as amostras positivas para coliformes totais são testadas quanto à presença de <i>E. coli</i> ?	5.2.2.6				
Cancelamento de amostras negativas para coliformes totais	5.2.2.7				
<u>Para amostras de águas para consumo humano</u> , todas as amostras que produzem turvação em CLT ou CL (crescimento abundante) na ausência de acidez ou gás são canceladas?	5.2.2.7.1				
Dentro de 24 horas, o Laboratório coleta ou solicita a coleta de nova amostra do mesmo local da amostra cancelada?					
Embora não seja requerido antes do cancelamento, o Laboratório realiza um teste confirmativo e um teste para coliformes fecais ou <i>E. coli</i> , ou ambos na cultura negativa para coliformes totais, para confirmar a inibição dos coliformes totais?					
E se o teste confirmativo resultar positivo para coliformes totais, fecais ou <i>E. coli</i> , o Laboratório relata esse resultado?					
Se esse teste resultar negativo, o Laboratório cancela a amostra?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para águas brutas destinadas a captação, todas as amostras que produzem turvação (crescimento abundante) na ausência de acidez ou gás são canceladas?	5.2.2.7.2				
O Laboratório coleta ou requisita a coleta de outra amostra do mesmo local que a amostra cancelada?					
Embora não requerido antes do cancelamento, o laboratório realiza um teste para confirmação da cultura negativa para coliformes, e se o teste der resultado positivo, o NMP (Número Mais Provável) é relatado?					
Se esse teste der resultado negativo, a amostra é cancelada?					
Teste Presença Ausência (P-A) para coliformes (para detecção de coliformes totais em águas para consumo humano)	5.2.3				
Meio	5.2.3.1				
Quando é utilizado o meio seis vezes concentrado ele é esterilizado por filtração em vez de autoclavação?	5.2.3.1.1				
O meio é autoclavado por 12 minutos a 121°C?	5.2.3.1.2				
O tempo total na autoclave é inferior a 30 minutos?					
Os frascos são colocados na autoclave com espaço entre eles?					
O pH final do meio é 6,8±0,2?					
Se o meio preparado é armazenado, ele é mantido num frasco de cultura a 1°-30°C ao abrigo da luz durante no máximo 3 meses?	5.2.3.1.3				
O meio armazenado é descartado se houver evaporação de mais de 10% do volume original?					
É inoculado um volume de 100mL de amostra no frasco de cultura?	5.2.3.2				
Após inoculação o frasco de cultura é incubado a 35°±0,5°C e é observada a presença de coloração amarela (acidez) após 24 e 48 horas?	5.2.3.3				
Culturas amarelas são confirmadas com CLVBB e é realizado um teste para coliformes fecais ou <i>E. coli</i> ?	5.2.3.4				
Todas as amostras que produzem uma cultura turva, mas não amarela, no meio P-A, são canceladas?	5.2.3.5				
O Laboratório coleta ou requisita a coleta, de uma outra amostra do mesmo local que a amostra cancelada?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Embora não seja requerido antes do cancelamento, o Laboratório realiza um teste confirmativo na cultura negativa para coliformes e um teste para coliformes fecais, <i>E. coli</i> ou ambos, e se o teste é positivo para coliformes, esse resultado é relatado?					
Se o resultado do teste confirmativo para coliformes for negativo, a amostra é cancelada?					
Teste para coliformes fecais (com meio EC para coliformes fecais em águas de consumo humano ou águas brutas para captação, ou meio A1 para águas brutas para captação apenas)	5.2.4				
Meio EC	5.2.4.1				
O meio EC é usado para detectar coliformes fecais em culturas positivas para coliformes totais de acordo com a “Total Coliform Rule”?	5.2.4.1.1				
A cultura positiva para coliformes de cada tubo ou frasco presuntivo, ou cada colônia positiva para coliformes (a menos que um “swab” esteja sendo usado) é transferida para um tubo contendo meio EC com tubo invertido?					
O meio EC é usado para contagem de coliformes fecais em águas brutas para captação, de acordo com a SWTR?	5.2.4.1.2				
Na realização da técnica de tubos múltiplos são inoculados três volumes da amostra de água bruta para captação em 5 ou 10 tubos para cada volume de amostra?					
A cultura positiva para coliformes de cada tubo é transferida para um tubo contendo o meio EC com um tubo invertido?					
O meio EC é autoclavado a 121°C por 12 a 15 minutos?	5.2.4.1.3				
O pH final do meio EC é 6,9±0,2?					
Os tubos invertidos são examinados para verificar a ausência de bolhas de ar e que pelo menos metade a dois terços dos mesmos são cobertos pelo meio de cultura após a adição da amostra?	5.2.4.1.4				
O meio EC é incubado a 44,5±0,2°C por 24±2 horas?	5.2.4.1.5				
O teste é considerado positivo para coliformes fecais, se for detectado gás no tubo invertido em uma cultura turva, independentemente de qualquer outro teste subsequente naquela cultura?	5.2.4.1.6				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Meio A1	5.2.4.2				
O meio A1 é utilizado apenas para quantificação de coliformes fecais em águas brutas para captação, segundo o SWTR e não para águas de consumo humano?	5.2.4.2.1				
São utilizados três volumes da amostra para 5 ou 10 tubos por volume de amostra?					
O meio A1 é autoclavado por 10 minutos a 121°C?	5.2.4.2.2				
O pH final do meio A1 é 6,9±0,1?					
Os tubos invertidos são examinados para verificar a ausência de bolhas de ar?	5.2.4.2.3				
O meio A1 é incubado a 35°±0,5°C durante três horas e em seguida a 44,5°±0,2°C durante 21±2 horas?	5.2.4.2.4				
Os tubos de tampas frouxas são mantidos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente no máximo por 2 semanas ou em tubos com tampa de rosca no máximo durante 3 meses*?	5.2.4.2.5				
A presença de gás no tubo invertido em um tubo com cultura turva é resultado positivo para coliformes fecais?	5.2.4.3				
<u>Meio azida dextrose</u> (para detecção de estreptococos fecais em águas subterrâneas)	5.2.5				
Para volumes de 100mL de amostra, é utilizada a concentração tripla (3x) preparada em frasco de cultura, que é autoclavado a 121°C por 15 minutos?	5.2.5.1				
O pH final do meio é 7,2±0,2?					
Um volume de amostra de 100mL é adicionado ao meio esterilizado que é então incubado a 35°±0,5°C?	5.2.5.2				
A cultura é verificada quanto à presença de turbidez após 24±2 horas?	5.2.5.3				
Se não for observada turbidez, a cultura é incubada novamente e verificada após um tempo total de 48±3 horas?					
Culturas turvas são confirmadas estriando-se uma porção do caldo em ágar bile-esculina (ABE) ou ágar azida bile esculina (AABE)?	5.2.5.4				
O ABE e o AABE são autoclavados a 121°C por 15 minutos?	5.2.5.5				
O pH final é 6,6±0,2 para o ABE e 7,1±0,2 para o AABE?					
Após a inoculação nesses meios, as placas são incubadas a 35°±0,5°C por 48 horas?	5.2.5.6				
As colônias marrom escuras com halo marrom no ABE ou no AABE são confirmadas como estreptococos fecais?	5.2.5.7				

**Observar que o período de manutenção recomendado pelo “Standard Methods” (APHA 1998) é de uma semana*

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Se for solicitado, o Laboratório realiza o teste para enterococos, transferindo uma ou mais colônias de estreptococos fecais para caldo cérebro-coração com 6,5% de NaCl e incubando esse caldo a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas?					
Testes com substrato enzimático (cromogênico e fluorogênico)	5.3				
Instruções gerais	5.3.1				
Para detecção de coliformes totais e <i>E. coli</i> em águas para consumo humano, o Laboratório usa um dos seguintes testes: MMO-MUG (Colilert), Colisure, E*Colite, Presença/Ausência ReadyCult Coliforms 100, Fluorocult LMX ou Colitag?	5.3.1.1				
Para contagem de coliformes totais em águas brutas para captação, o Laboratório usa o Colilert?					
Se o Laboratório utiliza um método baseado na fermentação da lactose para detectar coliformes totais em águas de consumo humano, e a amostra é positiva, a cultura é transferida para EC-MUG para detecção de <i>E. coli</i> , mas não para outro meio com substrato enzimático, conforme item 5.3?					
Meios	5.3.1.2				
O Laboratório adquire esses meios e não os prepara a partir de seus componentes?	5.3.1.2.1				
Os meios são mantidos ao abrigo da luz?	5.3.1.2.2				
Antes do uso, cada lote de meio é verificado quanto à fluorescência com uma lâmpada ultravioleta de 365-366nm e 6 watts de potência?	5.3.1.2.3				
Se o meio apresentar fluorescência fraca, é utilizado outro lote que não fluoresce?					
Se a amostra mais o meio apresentarem alteração de cor antes da incubação, o meio é descartado e é utilizado outro lote?	5.3.1.2.4				
Antes do uso, frascos e tubos de plástico e de vidro são verificados quanto à fluorescência, com lâmpada ultravioleta de 365-366nm e 6 watts de potência?	5.3.1.3				
Se eles apresentarem fluorescência, é utilizado outro lote?					
Quando é utilizado um saco Whirl-Pak ^{TR} para incubar o Colilert ou o Colitag, ou outro meio cuja coloração torna-se amarela para indicar resultado positivo, é utilizado um tipo que tem uma barreira (por ex. BO1417) para impedir emissões gasosas para outros sacos Whirl-Pak ^{TR} durante a incubação?	5.3.1.4				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Se é utilizada uma incubadora pequena, com camisa de ar, a temperatura das amostras é levada à temperatura ambiente antes da incubação?	5.3.1.5				
Se é utilizado um banho-maria, o nível da água fica acima do nível superior do meio?	5.3.1.6				
Para verificar a presença da <i>E.coli</i> , amostras positivas para coliformes totais são colocadas sob lâmpada UV (365-366nm) em ambiente escuro?	5.3.1.7				
O Laboratório evita utilizar testes enzimáticos para confirmar culturas presuntivas positivas para coliformes totais em caldo ou membrana?	5.3.1.8				
O Laboratório cancela toda amostra que produz uma alteração atípica de cor (na ausência de coloração amarela) e coleta ou requisita a coleta de outra amostra do mesmo local que a amostra cancelada?	5.3.1.9				
O Laboratório utiliza outro método para testar a segunda amostra?					
O comparador de referência é descartado na data de validade?	5.3.1.10				
Critérios para meios específicos	5.3.2				
Para o teste Colilert, as amostras são incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas?	5.3.2.1				
Uma amostra que apresenta coloração amarela igual ou mais intensa que a do comparador é considerada positiva para coliformes totais?					
Uma amostra que apresenta coloração menos intensa que a do comparador é incubada por 4 horas adicionais, mas sem superar o período total de incubação de 28 horas?					
Uma amostra que apresenta coloração menos intensa que a do comparador após 28 horas de incubação é considerada negativa para coliformes totais?					
As amostras positivas para coliformes totais que apresentam fluorescência sob lâmpada UV são consideradas positivas para <i>E.coli</i> ?					
Para o teste Colilert-18, as amostras são incubadas por 18 horas (até 22 horas se elas estiverem amarelas, porém mais claras que o comparador)?					
Para quantificação de coliformes totais em águas brutas para captação, o Laboratório utiliza o teste Colilert, com 5 a 10 tubos, Quanti-Tray, ou Quanti-Tray 2000 para cada diluição de amostra?	5.3.2.1.1				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Como água de diluição, utiliza-se água deionizada ou destilada estéril, em vez de água tamponada?					
CQ Se o Quanti-Tray ou Quanti-Tray 2000 são utilizados, a seladora é testada mensalmente pela adição de um corante à água?	5.3.2.1.2				
Para o teste Colisure, as amostras são incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas?	5.3.2.2				
Quando a coloração do meio é modificada de amarelo para vermelho a magenta, o resultado é considerado positivo para coliformes totais?					
Se a amostra positiva para coliformes totais apresenta fluorescência sob luz UV ela é considerada positiva para <i>E.coli</i> ?					
Para o teste E*Colite, a amostra é incubada a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas?	5.3.2.3				
Se a coloração de meio altera-se de amarelo para azul ou azul-esverdeado, ou observa-se uma coloração azul nos cantos do saco, o resultado é considerado positivo para coliformes totais?					
Se o meio apresenta fluorescência sob luz UV, a amostra é considerada positiva para <i>E.coli</i> ?					
Se não se observar fluorescência, a amostra é incubada por 20 horas adicionais (tempo total de incubação de 48 horas) e verificada novamente?					
Se o meio se torna vermelho, a amostra é descartada e solicita-se nova coleta?					
Para o teste Presença-Ausência Readycult Coliforms 100, o conteúdo do sachê é adicionado a 100mL de amostra, seguindo-se uma incubação a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 1 hora?	5.3.2.4				
Se a coloração do meio se altera de amarelo claro para azul-esverdeado, a amostra é considerada positiva para coliformes?					
Se o meio apresenta fluorescência azul clara brilhante sob luz UV longa (365-366nm), a amostra é considerada positiva para <i>E.coli</i> ?					
Para o teste com o Fluorocult LMX, o meio é adicionado à água purificada, agitado e aquecido até fervura para dissolução completa na água?	5.3.2.5				
Aliquotas de 100mL são transferidas para frascos de 250mL que são então autoclavados por 15 minutos?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Os frascos autoclavados são resfriados antes da adição de 100mL da amostra?					
O suplemento “ <i>E.coli</i> /coliform” não é adicionado ao meio?					
A amostra é então incubada a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 1 hora?					
Se o meio muda de cor, de amarelo claro para azul-esverdeado, a amostra é considerada positiva para coliformes?					
Se o meio apresenta fluorescência azul clara brilhante sob luz UV longa (365-366nm), a amostra é considerada positiva para <i>E.coli</i> ?					
Para o teste Colitag, as amostras são incubadas a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas?	5.3.2.6				
Se a cor do meio se altera para amarelo, as amostras são consideradas positivas para coliformes?					
Se o meio fluoresce sob luz UV, a amostra é considerada positiva para <i>E.coli</i> ?					
<u>Meio EC + MUG (para detecção de <i>E.coli</i>)</u>	5.3.3				
Se o meio EC+MUG é usado, a colônia ou as culturas positivas para coliformes são transferidas do frasco ou tubo presuntivo para esse meio?	5.3.3.1				
O pH final do meio EC+MUG é $6,9\pm 0,2$?	5.3.3.2				
Meio mais amostra são incubados a $44,5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas e então testados quanto à fluorescência?	5.3.3.4				
<u>Teste Enterolert (para detecção de enterococos em águas subterrâneas)</u>	5.3.4				
O meio é mantido ao abrigo da luz a $4^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}$ até a utilização?	5.3.4.1				
O reagente Enterolert é adicionado a 100mL de amostra e amostra mais meio são incubados a $41^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas?	5.3.4.2				
A fluorescência sob lâmpada UV é utilizada para indicar a presença de enterococos?					
Método da Membrana Filtrante (MF)	5.4				
Instruções gerais	5.4.1				
Para amostras de águas brutas para captação (SWTR), as diluições resultam em 20 a 80 colônias de coliformes totais ou 20 a 60 colônias de coliformes fecais para pelo menos uma diluição ou volume?	5.4.1.1				
CQ A esterilidade de pelo menos uma membrana e do funil é verificada no início e no final de cada série de filtração, filtrando-se 20-30mL de água de diluição estéril?	5.4.1.2				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Se o controle indica contaminação, o Laboratório rejeita todos os dados das amostras em questão e solicita coleta?					
CQ O Laboratório considera finda uma série de filtração quando 30 minutos ou mais se passam entre a filtração das amostras?					
Os funis são enxaguados após a filtração de cada amostra com duas ou três porções de água de enxágue estéril para garantir que toda a amostra é transferida do funil para a membrana?	5.4.1.3				
Discos absorventes são saturados com pelo menos 2mL de caldo e o excesso de meio é removido pela decantação da placa?	5.4.1.4				
<u>Método da MF para detecção de coliformes totais e <i>E.coli</i> em águas de consumo humano, contagem de coliformes totais ou fecais em águas brutas para captação e detecção de <i>E.coli</i> em águas subterrâneas</u>	5.4.2				
Meios para coliformes totais, coliformes fecais e <i>E.coli</i>	5.4.2.1				
Se o caldo ou ágar M-Endo, ágar M-Endo LES são utilizados para detecção de coliformes totais em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação, é utilizada a etapa única ou a técnica de enriquecimento?	5.4.2.1.1				
Etanol hidratado é utilizado no procedimento de reconstituição?					
O meio é preparado em frasco estéril?					
É utilizado um banho de água fervente ou placa quente com agitação para levar o meio próximo à ebulição mas sem permitir a fervura?					
O pH final para o meio M-Endo é 7,2±0,1 e 7,2±0,2 para o ágar M-Endo LES?					
O meio M-Endo ou o ágar M-Endo LES são incubados a 35°±0,5°C durante 22-24 horas?					
As colônias com brilho metálico são consideradas presuntivas para coliformes totais?	(5.4.2.2)				
Se é utilizado o meio m-Coli Blue para detectar coliformes totais e <i>E.coli</i> em águas de consumo humano, as ampolas são invertidas 2-3 vezes antes de serem quebradas e o conteúdo é então vertido de forma homogênea sobre o disco absorvente?	5.4.2.1.2				
Ampolas fechadas são mantidas no refrigerador ao abrigo da luz?					
Ampolas fechadas são descartadas na data de validade, ou antes, caso seja observada uma contaminação?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
O pH do meio é $7,0 \pm 0,2$?					
O m-Coli Blue é incubado a $35^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas?	(5.4.2.2)				
Colônias vermelhas são consideradas coliformes totais, e colônias azuis a púrpura <i>E. coli</i> ?	(5.4.2.2)				
Se o meio MI (com ou sem ágar) é utilizado para detectar coliformes totais e <i>E. coli</i> em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação, o frasco de meio adquirido pronto e pré-esterilizado não é autoclavado?	5.4.2.1.3				
O frasco de ágar MI pré-esterilizado é fundido em banho de água fervente (ou por outro processo recomendado pelo fabricante), cuidadosamente para não aquecer excessivamente o ágar?					
O meio é então resfriado lentamente e vertido em placas estéreis?					
Se é utilizado o meio desidratado, ele é preparado e autoclavado segundo as instruções do fabricante?					
O ágar é resfriado antes da adição de uma solução de cefsulodina recentemente preparada, esterilizada por filtração, e vertido em seguida em placas estéreis?					
O pH final do ágar MI é $6,95 \pm 0,20$, e do caldo MI é $7,05 \pm 0,20$?					
O meio MI é incubado a $35^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas?	(5.4.2.2)				
As colônias fluorescentes sob luz UV são consideradas coliformes totais, e as colônias azuis sob luz normal consideradas <i>E. coli</i> ?	(5.4.2.2)				
Se é utilizado o Ágar Chromocult Coliform para detecção de coliformes totais e <i>E. coli</i> em águas de consumo humano, o meio é autoclavado ou aquecido em excesso?	5.4.2.1.4				
O pH final desse meio é $6,8 \pm 0,2$?					
Se um crescimento abundante de bactérias heterotróficas é esperado, adiciona-se cefsulodina a 1L de meio resfriado (45° - 50°C), na forma de solução (10mg/2mL) em água deionizada ou destilada?					
O Chromocult é incubado a $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 1 hora?	(5.4.2.2)				
Colônias de coloração salmão a vermelha são consideradas coliformes totais e colônias azul-escuras a violetas <i>E. coli</i> ?	(5.4.2.2)				

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Se o Coliscan ^R é utilizado para detectar coliformes totais e <i>E.coli</i> em águas de consumo humano ou contagem de coliformes totais em águas brutas para captação, são seguidas as instruções do fabricante para reconstituição e adição do antibiótico?	5.4.2.1.5				
O antibiótico cefsulodina é aquecido excessivamente?					
O pH final do ágar Coliscan é 7,00±0,20?					
O Coliscan é incubado a 32°-37°C por 24-28 horas?	(5.4.2.2)				
Colônias vermelho-magenta são consideradas coliformes totais e colônias de coloração azul a púrpura <i>E.coli</i> ?	(5.4.2.2)				
O caldo m-FC, com ou sem ágar, utilizado para contagem de coliformes fecais, é autoclavado?	5.4.2.1.6				
O caldo m-FC é aquecido até próximo do ponto de ebulição?					
O pH final do meio m-FC é 7,4±0,2?					
O caldo m-FC é incubado a 44,5°±0,5°C por 24±2 h?	(5.4.2.2)				
As colônias azuis são consideradas coliformes fecais?	(5.4.2.2)				
O meio preparado é mantido na geladeira e levado a temperatura ambiente antes do uso?	5.4.2.1.7				
As placas de Petri contendo o meio são mantidas em um saco plástico ou recipiente bem fechado e utilizadas em 2 semanas?					
As placas com caldo preparado no laboratório são descartadas após 96 horas, placas com ágar após 2 semanas e caldo em ampolas na data de validade recomendada pelo fabricante?					
A data e a hora de preparo do meio são registradas?	5.4.2.3				
<u>Para cancelamento de uma amostra negativa para coliformes totais</u> todas as amostras com crescimento confluyente ou número excessivo de colônias para contagem são canceladas (a menos que pelo menos uma colônia de coliformes seja detectada)?	5.4.2.3				
Se nenhum coliforme é detectado, o resultado é relatado como “crescimento confluyente” ou “número excessivo de colônias para contagem” e a coleta de uma nova amostra do mesmo local é solicitada?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
O Laboratório realiza um teste na cultura negativa para coliformes antes do cancelamento?					
Se o teste de verificação for positivo para coliformes totais, o Laboratório relata o resultado como positivo para coliformes totais?					
Se o teste de verificação for negativo, a amostra é cancelada?					
<u>Para cancelamento de amostras de águas brutas para captação (SWTR)</u> , onde a densidade de coliformes deve ser determinada, o laboratório cancela amostras que resultem em crescimento confluyente ou com número excessivo de colônias para contagem, mesmo que coliformes totais ou fecais estejam presentes?	5.4.2.4				
<u>Para amostras de águas de consumo humano</u> , nos meios tipo M-Endo, todas as colônias com brilho metálico, até um máximo de 5, são verificadas com CL ou CLT e em seguida no CLVBB, ou com um teste para citocromo oxidase ou para β -galactosidase?	5.4.2.5				
Se não forem observadas colônias com brilho metálico, são verificadas até 5 colônias com brilho duvidoso ou com coloração vermelha sem brilho e representando diferentes tipos morfológicos?					
<u>Para amostras de águas de consumo humano</u> , as colônias positivas para coliformes totais são diferenciadas para <i>E. coli</i> ou coliformes fecais?	5.4.2.6				
Quando o meio EC ou EC+MUG é utilizado, as colônias são transferidas segundo uma das opções especificadas na “Total Coliform Rule”?					
Quando a técnica com “swab” é utilizada, emprega-se somente um “swab” para inocular uma amostra presuntiva positiva para coliformes totais primeiro no EC ou EC+MUG, em seguida no CLT e por último no CLVBB ?					
<u>Para amostras de água bruta para captação</u> , a contagem inicial de coliformes totais é calculada novamente após a verificação?	5.4.2.7				
<u>CQ Para amostras de água bruta para captação</u> , quando há dois ou mais analistas, cada um conta as colônias de coliformes totais ou fecais na mesma membrana mensalmente, e essas contagens não diferem em mais de 10%?	5.4.2.8				

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Teste ágar nutriente + MUG (para detecção de <i>E.coli</i> em águas de consumo humano ou águas subterrâneas)	5.4.3				
O meio é autoclavado a 121°C durante 15 minutos?	5.4.3.1				
A concentração final de MUG é 100µg/L?					
O pH final do meio AN+MUG é 6,8±0,2?					
CQ Culturas controle positivas e negativas são testadas conforme determinado no item 5.1.5.4?	5.4.3.2				
CQ As culturas controle são filtradas ou inoculadas na membrana filtrante com ágar ou caldo M-Endo ou ágar M-Endo LES, e incubadas a 35±0,5°C?					
CQ O filtro é então transferido para AN+MUG e incubado por mais 4 horas a 35±0,5°C?					
CQ Esses resultados são lidos e registrados?					
A membrana filtrante contendo colônias de coliformes totais é transferida para a superfície do meio ágar nutriente + MUG?	5.4.3.3				
Como teste para verificação de coliformes totais, uma porção de cada colônia é transferida com uma agulha, antes da transferência da membrana ou após o tempo de incubação de 4 horas no AN+MUG?					
Alternativamente a superfície da membrana é raspada com “swab” de algodão estéril, após as 4 horas de incubação no AN+MUG e então transferida para o teste de coliformes totais?					
O meio AN+MUG inoculado é incubado a 35±0,5°C por 4 horas?	5.4.3.4				
A fluorescência é verificada com lâmpada UV (365-366nm) com bulbo de 6 watts, em ambiente escuro, e considera-se a presença de fluorescência no halo ao redor da colônia com brilho metálico resultado positivo para <i>E.coli</i> ?	5.4.3.5				
Método MF para detecção de enterococos/estreptococos fecais em águas subterrâneas	5.4.4				
Meios	5.4.4.1				
Quando o ágar ME é usado para detecção de enterococos, o ágar ME base é preparado, autoclavado e resfriado antes da adição do ácido nalidíxico (ou seu sal sódico) e cloreto de trifetil tetrazólio, separadamente?	5.4.4.1.1				
O pH final do ágar ME é 7,1±0,2?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Quando o <u>ágar m-Enterococcus</u> é usado para detecção de estreptococos fecais (não de enterococos) o meio é aquecido e não autoclavado para dissolver os ingredientes?	5.4.4.1.2				
O pH final do ágar m-Enterococcus é $7,2 \pm 0,2$?					
Quando o <u>ágar MEI</u> é usado para detecção de enterococos, 0,75g de indoxil- β -D-glicosídeo são adicionados a 1L do ágar ME base e a preparação segue o item 5.4.4.1.1, exceto que somente 0,2g/L de cloreto de trifetil tetrazólio são adicionados?	5.4.4.1.3				
O pH final do ágar MEI é $7,1 \pm 0,2$?					
Um volume de 100mL de amostra é filtrado e a membrana colocada nesse meio?	5.4.4.2				
Se é usado o ágar m-Enterococcus, as placas são incubadas em posição invertida a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 48 horas?	5.4.4.3				
As colônias vermelho escuras e vermelho claras são contadas como estreptococos fecais, utilizando aumento e lâmpada fluorescente?					
Se é usado o ágar ME, as placas são incubadas em posição invertida a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 48 horas?	5.4.4.4				
A membrana é então transferida para o meio EIA, que é incubado a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 20-30 minutos?					
Todas as colônias rosa a vermelhas com halo de precipitação negro ou castanho-enegrecido na parte de baixo do filtro no ágar ME são contadas com aumento e lâmpada fluorescente e são consideradas enterococos?					
Se o ágar MEI é usado, as placas são incubadas em posição invertida por 24 horas a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$?	5.4.4.5				
Com aumento e lâmpada fluorescente, fundo da placa e superfície do ágar são examinadas quanto à presença de colônias com halo azul (independentemente da cor da colônia) e estas são consideradas positivas para enterococos?					
Contagem de bactérias heterotróficas (em águas de consumo humano)	5.5				
O Laboratório usa o método de inoculação em profundidade ou o SimPlate para contagem de bactérias heterotróficas em águas para consumo humano e para testar a água purificada?	5.5.1				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para sistemas aos quais é permitida uma variação do nível máximo de contaminante da TCR, o laboratório usa o meio R2A segundo descrito na Seção 9215 do “Standard Methods” para contagem de bactérias heterotróficas em águas para consumo humano?					
Meios	5.5.2				
O pH final do meio para o “Plate Count Agar” é $7,0 \pm 0,2$, para o R2A ágar $7,2 \pm 0,2$ e para o SimPlate $7,2 \pm 0,2$?					
Para o método de inoculação em profundidade, o ágar fundido é resfriado até $44^{\circ}\text{--}46^{\circ}\text{C}$ em banho-maria e mantido no máximo por 3 horas antes de ser colocado nas placas?	5.5.3				
O meio estéril é fundido apenas uma vez?					
Para o método de inoculação em superfície, 15mL do meio R2A ou outro meio são colocados na placa de Petri estéril para solidificação?	5.5.4				
O meio em frascos ou tubos de tampa de rosca é mantido na geladeira por 6 meses no máximo, e quando em placas de Petri por 2 semanas no máximo (uma semana para R2A em placas)?	5.5.5				
Para obter contagens na faixa ideal para a maior parte das amostras de águas de consumo humano, volumes de 1,0mL ou 0,1mL da amostra não-diluída são colocados nas placas?	5.5.6				
São preparadas placas em duplicata de cada diluição testada?					
Para o método de inoculação em profundidade, a amostra é pipetada assepticamente no fundo de uma placa de Petri estéril e então 10-12mL de ágar fundido e resfriado são adicionados?	5.5.7				
A amostra e o ágar são misturados de forma a evitar derramamento?					
Após a solidificação das placas numa superfície plana, elas são invertidas e incubadas a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas?					
As placas são empilhadas (no máximo 4) e colocadas na incubadora de forma a permitir a circulação do ar e manter a temperatura uniforme?					
O Laboratório pode garantir que a incubadora não tem umidade excessiva e que as placas não perdem mais que 15% do peso durante as 48 horas de incubação?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para o método de inoculação em superfície, 0,1mL ou 0,5mL da amostra (ou diluição) são pipetados na superfície do ágar previamente submetido a secagem e então espalhados com um bastão de vidro inclinado estéril?	5.5.8				
O inóculo é absorvido completamente antes da incubação?					
As placas são incubadas em posição invertida a 20°-28°C por 5 a 7 dias?					
Para a técnica de membrana filtrante, o volume filtrado resulta em 20-80 colônias?	5.5.9				
A membrana é transferida para uma placa de Petri contendo 5mL de meio R2A solidificado e segue-se uma incubação a 20°-28°C por 5 a 7 dias?					
As placas com tampas frouxas são colocadas numa caixa plástica com tampa hermética, contendo papel toalha umedecido, e esse papel é novamente umedecido se necessário?					
As colônias são contadas com microscópio estereoscópico com 10-15X de aumento?					
Método SimPlate	5.5.10				
Para uma <u>amostra de Dose Única</u> um volume de 10mL de amostra é adicionado a um tubo de ensaio contendo meio SimPlate desidratado e esse conteúdo é então vertido no centro de uma placa contendo 84 pequenas cavidades?	5.5.10.1				
Alternativamente, 9mL de diluente estéril são adicionados ao tubo de ensaio contendo o meio desidratado, em seguida adiciona-se 1mL da amostra, e então meio mais amostra são vertidos no centro da placa contendo 84 pequenas cavidades?					
A mistura é distribuída uniformemente nas 84 cavidades e o excesso de líquido é drenado no disco absorvente da placa?					
A placa invertida é incubada a 35°±0,5°C por 45-72 horas?					
A densidade bacteriana é determinada contando-se o número de cavidades fluorescentes sob luz UV de 365-366nm e esse valor é convertido em Número Mais Provável/mL utilizando-se a tabela de NMP de dose unitária do fabricante?					
Se um volume de 10mL de amostra for usado, o NMP de dose unitária/mL é lido diretamente, ou se um volume de 1mL de amostra for usado, o valor de NMP/mL é multiplicado por 10 para correção?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para <u>Múltiplas Doses para 10 amostras de 1mL cada</u> , um volume de 100mL de diluente estéril é adicionado ao meio SimPlate desidratado e agita-se tudo para dissolução?	5.5.10.2				
Um volume de 1,0mL de amostra é então pipetado no centro da placa seguido de 9mL do meio reconstituído?					
A placa é então suavemente movida para misturar e distribuir a amostra e o meio igualmente nas 84 cavidades, sendo em seguida o excesso de meio drenado no disco absorvente da placa?					
A placa é invertida e incubada a $35^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 45-72 horas?					
A densidade bacteriana é determinada contando-se o número de cavidades fluorescentes sob luz UV de 365-366nm e esse valor é convertido em Número Mais Provável/mL utilizando-se a tabela de NMP de dose múltipla do fabricante?					
Se foram feitas diluições da amostra, o NMP/mL é multiplicado pelo fator de diluição?					
Para a técnica de inoculação em profundidade e em superfície, as colônias são contadas manualmente utilizando-se um contador de colônias de campo escuro?					
Somente placas contendo 30 a 300 colônias são contadas, exceto para placas inoculadas com 1,0mL de amostra não diluída e nesse caso contagens de menos de 30 colônias são aceitáveis?					
CQ Cada lote de ágar é verificado quanto à esterilidade preparando-se uma placa final de controle?	5.5.1.2				
CQ O Laboratório rejeita os dados se o controle estiver contaminado?					
Colifagos (Método 1601 e 1602 proposto para GWR)	5.6				
<u>Método EPA 1601: Colifagos somáticos e F+-específicos em águas com enriquecimento em duas etapas</u>	5.6.1				
O volume de 100mL (ou de 1L) de amostra é suplementado com cloreto de magnésio, bactéria hospedeira em fase log de crescimento e caldo tripton e soja (CTS) para a primeira etapa de enriquecimento?					
Após incubação “overnight”, as amostras são aplicadas na camada de bactéria hospedeira, e as placas são incubadas e então examinadas quando à presença de zonas de lise?					

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Meios	5.6.1.1				
Os antibióticos são sempre adicionados aos meios após sua autoclavagem?	5.6.1.1.1				
As soluções estoque de antibióticos são mantidas congeladas a -20°C por no máximo um ano?					
As soluções estoque de antibióticos são descongeladas à temperatura ambiente ou rapidamente em banho-maria a 37°C e bem misturadas antes do uso?					
O CTS 10X é mantido a 1°- 5°C até o uso?	5.6.1.1.2				
Após solidificação, as placas com ágar triptona e soja (ATS) 1,5% suplementadas com antibiótico e as que não foram utilizadas são conservadas a 1°- 5°C, em posição invertida, por no máximo 2 semanas?	5.6.1.1.3				
O meio ATS 0,7% de superfície, contendo os antibióticos apropriados, é distribuído em volumes de 5mL em tubos estéreis de 10mL, que são rotulados e mantidos a 45°-48°C até o uso?	5.6.1.1.4				
Esses tubos são usados no dia da sua preparação?					
As placas que apresentam condensação após a armazenagem são incubadas por cerca de 10 minutos para reduzir a condensação, antes da aplicação?	5.6.1.1.5				
As placas são usadas no mesmo dia ou mantidas a 1°- 5°C no máximo 4 dias?					
Estoque de colifagos	5.6.1.2				
Os estoques de colifagos MS2 (ATCC 15597B1 F-específicos) e phi-X 174 (ATCC 13706-B1 somáticos) são mantidos a 2°-8°C por no máximo 5 anos?	5.6.1.2.1				
A análise de esgoto bruto filtrado é iniciada em até 24 horas após a coleta?	5.6.1.2.2				
São obtidos pelo menos 10mL de esgoto filtrado?	5.6.1.2.4				
Se o esgoto filtrado é mantido por mais de 24 horas, ele é titulado novamente antes do uso?	5.6.1.2.5				
Cultura estoque da bactéria hospedeira	5.6.1.3				
Após a preparação, as culturas estoque da bactéria hospedeira são mantidas a -20° ou a -70°C?	5.6.1.3.1				
As bactérias são mantidas no máximo por 2 semanas a -20°C e 1 ano a -70°C?					
As culturas estoque de bactéria hospedeira preparadas “overnight” são mantidas em gelo ou a 1°-5°C até o momento do uso?	5.6.1.3.2				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Após a preparação, a cultura estoque em fase log de crescimento é mantida em gelo ou a 1°-5°C para diminuir a replicação até o momento do uso?	5.6.1.3.3				
Quando armazenadas, essas suspensões são mantidas por no máximo 48 horas?					
O restante da cultura estoque de bactéria hospedeira é mantido a 1°-5°C “overnight” para inocular frascos e obter novas suspensões de bactéria em fase log de crescimento?					
CQ Instruções Gerais	5.6.1.4				
Demonstração inicial de capacidade (DIC)	5.6.1.4.1				
CQ O laboratório demonstrou desempenho aceitável do método pela realização de um teste DIC antes de analisar amostras de campo?					
CQ O teste DIC consistiu em 10 amostras de água purificada contaminada com esgoto filtrado quantificado ou equivalente, contendo 1-2 UFP/mL para cada amostra e para cada tipo de colifago, de acordo com a tabela DIC?					
CQ Esses testes DIC foram acompanhados de um branco do método para cada tipo de colifago utilizado?					
Branco do Método	5.6.1.4.2				
CQ O branco do método (amostra de água purificada) é analisado para demonstrar ausência de contaminação?					
Para cada tipo de colifago utilizado, uma amostra de água purificada estéril é preparada e analisada com o mesmo procedimento usado para análise de amostras de campo e de CQ?					
CQ Pelo menos um branco do método é analisado para cada placa utilizada para amostras de campo?					
Controles positivos	5.6.1.4.3				
CQ Os controles positivos são analisados para garantir que as suspensões estoque de colifagos, de culturas bacterianas hospedeiras e o meio de crescimento estão funcionando adequadamente?					
CQ Para cada tipo de colifago utilizado, um volume de 100mL de água purificada é contaminado com 20 UFP de esgoto filtrado ou 60 UFP de uma cultura estoque pura?					
CQ Pelo menos um controle positivo é analisado para cada placa utilizada para amostras de campo?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Se várias placas são inoculadas com amostras no mesmo dia, é utilizada uma única amostra de controle positivo enriquecido para inocular todas essas placas?					
Contaminação de matriz (CM)	5.6.1.4.4				
CQ O desempenho do método é avaliado pela análise de um conjunto de amostras CM para cada tipo de colifago utilizado, quando são recebidas amostras de um novo tipo de água subterrânea?					
CQ Para cada tipo de colifago analisado, pelo menos três amostras de campo são contaminadas com 1-2 UFP, e pelo menos uma das três amostras resulta positiva para cada tipo de colifago utilizado?					
CQ Pelo menos um conjunto de amostras CM é analisado regularmente a cada vigésima amostra de campo de cada tipo de água subterrânea?					
CQ Essas amostras CM são coletadas simultaneamente às amostras de campo?					
CQ O volume total dessas amostras é contaminado com as concentrações indicadas nas tabelas de contaminação CM e DCC?					
Demonstração contínua de capacidade (DCC)	5.6.1.4.5				
CQ O laboratório demonstra que o sistema analítico está sob controle continuamente pela análise de amostras DCC?					
CQ Três amostras de água purificada são contaminadas com 1-2 UFP para cada tipo de colifago utilizado?					
CQ Essas amostras DCC são analisadas exatamente como amostras de campo?					
CQ Pelo menos uma dessas três amostras DCC é positiva para cada tipo de colifago usado?					
CQ Pelo menos um conjunto de amostras DCC é analisado a cada 20 amostras de campo e de amostras CM, ou um por semana, o que ocorrer com maior frequência?					
CQ O volume total de amostra é contaminado nas concentrações indicadas nas tabelas de contaminação CM e DCC?					
Estudos de desempenho	5.6.1.4.6				
CQ O Laboratório analisa periodicamente amostras de CQ externas, se disponíveis?					
CQ O Laboratório participa dos estudos interlaboratoriais disponíveis?					

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ O Laboratório revê os resultados, corrige o desempenho insatisfatório e registra as ações corretivas?					
<u>Método EPA 1602: Colifagos somáticos e F+ específicos em água pelo método da camada simples de ágar</u>	5.6.2				
A amostra de 100mL de água subterrânea é suplementada com cloreto de magnésio e a bactéria hospedeira, e então adicionada a 100mL de ágar tripton e soja concentração dupla fundido contendo o antibiótico apropriado?					
Amostra e meio são bem misturados e o volume total é vertido em 5 a 10 placas?					
Após incubação “overnight”, as zonas circulares de lise são registradas como colifagos?					
Meios	5.6.2.1				
Quanto aos antibióticos, eles são sempre adicionados ao meio <u>após</u> sua autoclavação?					
As soluções estoque dos antibióticos são mantidas congeladas a -20°C por 1 ano no máximo?					
As soluções estoque dos antibióticos são descongeladas à temperatura ambiente ou rapidamente em banho-maria a 37°C e bem homogeneizadas antes do uso?					
O CTS 10X é mantido a 1°-5°C até o uso?					
As placas de ATS 1,5%, suplementadas com antibióticos, que não são utilizadas, são mantidas a 1°-5°C no máximo por duas semanas?					
Os tubos estéreis de 10mL com 5mL de “top” ATS 0,7%, com os antibióticos adequados, são rotulados e mantidos a 45°-48°C até o momento do uso?					
Esses tubos são utilizados no mesmo dia do preparo?					
As placas que desenvolvem condensação durante o armazenamento são incubadas por aproximadamente 10 minutos antes da inoculação?					
Essas placas são utilizadas no mesmo dia ou mantidas a 1°-5°C no máximo por 4 dias?					
O ATS 2X com os antibióticos apropriados é mantido fundido a 45°-48°C em banho-maria?	5.6.2.1.2				
Esse ágar é utilizado somente no dia da preparação?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Estoques de colifagos	5.6.2.2				
O estoque de colifagos MS2 (ATCC 15597-B1 F-específicos) e phi-X 174 (ATCC 13706-B1 somáticos) é mantido a 2°-8°C por no máximo 5 anos?					
A análise de esgoto bruto filtrado é iniciada em até 24 horas após a coleta?					
São obtidos pelo menos 10mL de esgoto filtrado?					
Se o filtrado é armazenado mais de 24 horas, ele é titulado novamente antes do uso?					
Estoques de bactérias hospedeiras	5.6.2.3				
Depois da preparação os estoques de bactérias hospedeiras são mantidos a -20°C ou a -70°C?					
As bactérias são armazenadas no máximo por 2 meses a -20°C e no máximo 1 ano a -70°C?					
Após a preparação culturas estoque “overnight” das bactérias são resfriadas em gelo ou a 1°-5°C até o uso?					
Após a preparação as culturas estoque de bactérias hospedeiras em fase log de crescimento são resfriadas em gelo ou a 1°-5°C para diminuir a replicação até o uso?					
Quando essas suspensões são armazenadas, o tempo máximo é de 48 horas?					
O restante das culturas de bactérias hospedeiras, mantido a 1°-5°C “overnight”, é usado para inocular frascos para preparação de novas bactérias hospedeiras em fase log?					
CQ Instruções gerais	5.6.2.4				
Precisão e recuperação inicial (PRI)	5.6.2.4.1				
CQ O laboratório demonstrou capacidade para realizar esse método de maneira aceitável pela realização do teste PRI antes de analisar amostras de campo?					
CQ O teste PRI consiste em 4 amostras de água purificada testadas para cada tipo de colifago, contaminadas com esgoto filtrado quantificado ou equivalente, e que resulte em uma concentração de 80 UFP por amostra?					
CQ O desvio padrão relativo da recuperação (DPR) e a porcentagem de recuperação média ($\bar{x}$) calculados em resultados de 4 amostras para cada tipo de colifago usado, atende aos critérios de aceitação na tabela de critérios de aceitação CQ?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Branco do método	5.6.2.4.2				
CQ Pelo menos um branco do método (água purificada sem colifagos) é analisado com cada lote analítico para demonstrar ausência de contaminação?					
CQ Para cada tipo de colifago utilizado são preparadas e analisadas amostras de água purificada estéril utilizando os mesmos procedimentos das análises de campo e de CQ?					
CQ Um lote analítico é definido como todas as amostras analisadas durante um único dia, até o máximo de 20 (amostras de campo e amostras de contaminação de matriz) para cada tipo de colifago usado?					
Contaminação de matrizes (CM)	5.6.2.4.3				
CQ O desempenho do método é avaliado pela análise de um conjunto de amostras CM para cada tipo de colifago usado quando são recebidas amostras de um novo tipo de água subterrânea?					
CQ Um novo conjunto de amostras CM é analisado a cada 20 amostras de campo para cada água subterrânea?					
CQ Se a recuperação de colifagos estiver abaixo do limite (ver a tabela de critérios de aceitação), o desempenho do método é considerado inaceitável?					
CQ Se os resultados de PRC não estiverem dentro dos limites de controle, o problema é identificado e corrigido e as análises de amostras CM e de campo associadas são repetidas?					
CQ O laboratório mantém uma carta-controle sobre a recuperação e esta é atualizada regularmente?					
Precisão e recuperação contínua (PRC)	5.6.2.4.4				
CQ O laboratório demonstra desempenho aceitável pela análise de amostras PRC?					
CQ Para cada tipo de colifago utilizado, uma amostra de água purificada é contaminada com cerca de 80UFP?					
CQ Pelo menos uma amostra de PRC é analisada da mesma forma que uma amostra de campo?					
CQ O Laboratório analisa uma amostra de PRC a cada lote analítico?					
CQ O Laboratório compara a porcentagem de recuperação da PRC (R) com os limites correspondentes na tabela de critérios de aceitação CQ?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
CQ Se R estiver fora dos limites de recuperação, a análise é interrompida até que o problema seja identificado, corrigido e outro teste PRC seja realizado com resultados satisfatórios?					
Estudos de desempenho	5.6.2.4.5				
CQ O Laboratório analisa periodicamente amostras de CQ externas, se estas estiverem disponíveis?					
CQ O Laboratório participa dos estudos interlaboratoriais disponíveis?					
CQ O Laboratório revê esses resultados, corrige o desempenho insatisfatório e registra ações corretivas?					
6 COLETA, MANIPULAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS					
Coletor	6.1				
O coletor de amostras é treinado em técnicas assépticas e, se necessário, aprovado pela autoridade reguladora adequada ou seu representante designado?					
Amostragem	6.2				
As amostras de água de consumo humano coletadas segundo a TCR são representativas do sistema de distribuição?	6.2.1				
As torneiras de água não possuem aeradores, filtros, anexos, misturadores e sistemas de purificação?					
São amostradas torneiras de água fria?					
As linhas são limpas antes da amostragem mantendo-se um fluxo de água constante por pelo menos 2 minutos ou até que uma temperatura estável da água seja atingida?					
Pelo menos 100mL de amostra são coletados, deixando-se 2cm de espaço livre para facilitar a homogeneização da amostra por agitação?					
Um formulário com informações sobre a amostra é preenchido após a coleta?					
Se o frasco estiver completamente cheio, para permitir a homogeneização adequada, todo o conteúdo é transferido para um recipiente estéril maior e agitado antes da análise?					
Para o SWTR, as amostras de águas brutas para captação, representativas do manancial, são coletadas próximo ao ponto de captação, porém a distância razoável da margem?	6.2.2				
O volume coletado é suficiente para realizar todos os testes solicitados?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para a análise de colifagos, <i>E coli</i> ou enterococos, conforme a GWR, um volume de pelo menos 100mL é coletado?					
Conservação da amostra	6.3				
Para amostras de águas de consumo humano para bacteriologia, o coletor é aconselhado a mantê-las a <10°C durante o transporte para o Laboratório?					
Para amostras de águas brutas para captação, as amostras são mantidas <10°C durante o transporte para o Laboratório?					
O Laboratório rejeita amostras congeladas?					
Para análise de colifagos segundo a GWR, as amostras são despachadas a <10°C, mantidas a 1°-5°C e não são congeladas?	6.3.2				
CQ Para amostras em atendimento à SWTR e para colifagos, o Laboratório registra a temperatura no recebimento?	6.3.3				
CQ O Laboratório assinala amostras que têm temperatura >10°C no recebimento, estejam refrigeradas ou não, a menos que o tempo entre coleta e recebimento seja inferior a 2 horas?					
Prazo de validade/ tempo para transporte	6.4				
Para análise de coliformes totais em águas para consumo humano, o tempo entre a coleta e a colocação da amostra na incubadora é inferior a 30 horas?	6.4.1				
Todas as amostras são analisadas no dia de recebimento?					
As amostras recebidas ao final do dia são mantidas na geladeira “overnight”, somente se a análise puder ser iniciada em 30 horas após a coleta?					
Para coliformes totais e fecais em águas brutas para captação, e para bactérias heterotróficas em águas de consumo humano, o tempo entre a coleta da amostra e sua colocação na incubadora é menor que 8 horas?	6.4.2				
Para análise de colifagos, o tempo entre a coleta da amostra e sua colocação na incubadora é menor que 48 horas?	6.4.3				
Para análise de colifagos, o tempo entre a coleta do esgoto e a análise de suspensões contaminadas para CQ é menor que 24 horas, a menos que o esgoto seja titulado novamente e o título não tenha diminuído em mais de 50%?					
Se o título não diminuiu em mais de 50%, o esgoto é mantido por no máximo 72 horas?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Para análise de <i>E.coli</i> e enterococos conforme a GWR, o tempo entre a coleta da amostra e a colocação na incubadora é inferior a 30 horas?	6.4.4				
Formulário para coleta de amostras	6.5				
Após a coleta, o coletor registra as seguintes informações, em tinta indelével, no formulário para coleta? -Nome do sistema (número de identificação PWSS se disponível) -Identificação da amostra, (se houver) -Local da coleta -Tipo de amostra (por ex., distribuição, recoleta, bruta ou do processo ou outro objetivo especial) -Data e hora da coleta -Análises requeridas -Residual de desinfetante -Nome do coletor -Observações					
Cadeia de custódia	6.6				
São aplicadas as legislações estatais referentes a cadeia de custódia pelos coletores da amostra e o Laboratório?					
7 GARANTIA DA QUALIDADE					
O Laboratório tem um plano escrito de GQ disponível para inspeção?	7.1				
O Laboratório segue o plano de GQ escrito?					
O Laboratório tem um Procedimento Operacional Padronizado disponível para revisão referente à sua própria calibração de equipamentos ou instrumentos?					
O Laboratório analisa com bons resultados pelo menos um conjunto de amostras PT anualmente para cada método para o qual é certificado?	7.2				
Para métodos usados para avaliar a presença ou ausência de um organismo em uma amostra, o Laboratório analisa cada conjunto de amostras PT usando um único método analítico?					
8 REGISTROS E RELATÓRIOS					
Defesa legal	8.1				
Os dados de atendimento à legislação que estão sendo mantidos pelo laboratório são completos e exatos e assim legalmente defensíveis?					
O plano de garantia da qualidade e os POPs do Laboratório descrevem as políticas e os procedimentos utilizados para manutenção dos registros?					

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Se as amostras tiverem que constituir uma ação legal, o Laboratório segue os procedimentos de cadeia de custódia?					
Manutenção dos registros	8.2				
O sistema público de água mantém registros das análises microbiológicas por 5 anos?					
O Laboratório mantém registros de fácil acesso por 5 anos ou até a próxima auditoria de certificação, o que for mais longo?					
O Laboratório notifica o cliente do sistema público de água antes de eliminar os registros, de forma que ele possa requisitar cópias se necessário?					
O Laboratório faz uma cópia de segurança dos dados eletrônicos em um disco, fita ou em papel?					
Quando o Laboratório altera seus programas de computador, existem procedimentos estabelecidos para transferir dados antigos para o novo sistema de forma que estes sejam disponíveis nos tempos especificados?					
Registros de amostragem	8.3				
Todos os dados são registrados a tinta, e as alterações são riscadas de forma que o registro anterior seja visível?					
As alterações são implantadas e datadas?					
O Laboratório tem as seguintes informações prontamente disponíveis? -Data e hora de recebimento da amostra no Laboratório -Nome do funcionário que recebeu a amostra no Laboratório -Informações sobre qualquer anormalidade nas condições da amostra	8.3.1-4				
As amostras são canceladas pelas seguintes razões? -Tempo excedido entre coleta da amostra e o recebimento no Laboratório; -A presença de desinfetante na amostra é notada, por exemplo, pelo odor; - Evidência de congelamento; -Uso de frasco não aprovado pelo Laboratório para o uso pretendido; -Volume de amostra insuficiente, por exemplo <100mL; -É notada a presença de contaminantes interferentes, por exemplo, hidrocarbonetos, metais pesados, detergentes, etc.; -Temperatura da amostra superior ao limite permitido.	8.3.4				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Registros analíticos	8.4				
Todos os dados são registrados a tinta, e quaisquer alterações são riscadas de forma que o registro anterior seja visível?					
Essas alterações são implantadas e datadas?					
As seguintes informações são facilmente disponíveis? -Informações sobre a identificação de amostras; -Informações sobre dia e hora do início das análises; - Nome do laboratório e assinatura ou iniciais do funcionário que realiza as análises; -Informações sobre as técnicas ou métodos analíticos utilizados; -Informações sobre os itens assinalados com “CQ”; -Resultados das análises.					
Manutenção preventiva	8.5				
O Laboratório tem um programa de manutenção preventiva e registro dos consertos para todos os instrumentos e equipamentos?					
Esses registros são mantidos por 5 anos, de forma a permitir a inspeção?					
9 AÇÕES EM RESPOSTA AOS RESULTADOS LABORATORIAIS					
Culturas positivas para coliformes totais	9.1				
Para a “Total Coliform Rule“, o Laboratório testa todas as culturas positivas para coliformes quanto à presença de coliformes fecais ou <i>E. coli</i> ?					
Notificação de resultados positivos	9.2				
Para a “Total Coliform Rule“, o Laboratório notifica imediatamente a autoridade competente sobre uma cultura positiva para coliformes totais, fecais ou <i>E.coli</i> , de forma que as ações de acompanhamento possam ser realizadas?	9.2.1				
Para a “Total Coliform Rule“, se uma amostra é positiva para coliformes fecais ou <i>E.coli</i> , o sistema notifica o Estado logo que é notificado do resultado do teste, ou seja, ao final daquele dia, ou se o escritório do Estado estiver fechado, até o final do próximo dia útil?	9.2.2				
O resultado positivo para coliformes resulta da fase confirmativa da técnica de tubos múltiplos ou presença-ausência, ou do resultado verificado para a técnica de membrana filtrante se está sendo usado o meio M-Endo ou ágar M-Endo LES?	9.2.3				

LISTA DE VERIFICAÇÃO – MICROBIOLOGIA

Item	Número	Sim	Não	NA	Comentários
Se uma cultura positiva para coliformes totais não é confirmada como tal, mas se é constatado que é positiva para coliformes fecais ou <i>E.coli</i> , a amostra é considerada positiva para coliformes totais e fecais ou <i>E.coli</i> ?					
Notificação de interferência nos coliformes totais	9.3				
Para a “Total Coliform Rule”, o Laboratório notifica imediatamente a autoridade competente quando os resultados indicam que bactérias não-coliformes podem ter interferido com a análise de coliformes totais?					