

CETESB	AValiação DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DE ÁGUA Procedimento	L5.010 DEZ/89
--------	--	------------------

SUMÁRIO	Pág.
1 Introdução.....	1
2 Objetivo.....	2
3 Normas complementares.....	2
4 Definições.....	2
5 Aparelhagem.....	3
6 Execução do ensaio.....	9
Anexo A - Referências bibliográficas.....	31

1 INTRODUÇÃO

A crescente ênfase em relação à importância do monitoramento da qualidade da água do ponto de vista bacteriológico impõe a necessidade de avaliação dos laboratórios responsáveis pela realização dessas análises, com o objetivo de verificar se informações corretas, confiáveis e adequadas à sua finalidade estão sendo fornecidas pelos mesmos.

Os programas de avaliação dão ênfase à utilização de procedimentos padronizados, de tal modo que os dados produzidos por diferentes laboratórios possam ser uniformemente interpretados e requerem o desenvolvimento de um programa de controle de qualidade analítica orientado no sentido de ser obtida uma garantia total de qualidade em cada laboratório. Este controle de qualidade envolve o conjunto de medidas que, levadas a efeito, garantam a obtenção de resultados confiáveis e não se orienta unicamente no controle de qualidade de equipamentos e reagentes ou no controle de qualidade do pessoal e continuidade de seu treinamento; apresenta um sentido bem mais amplo e envolve a consideração de todos os elementos que possibilitem a melhoria do trabalho no laboratório.

É de fundamental importância a sistematização de um programa de controle de qualidade analítico, no qual sejam considerados todos os aspectos relativos às análises bacteriológicas de água, desde a coleta das amostras até a emissão dos resultados. Estes programas rígidos devem ser desenvolvidos por todos os laboratórios que atuam na execução dessas análises e assumem uma importância particular naqueles em que apenas esporadicamente são realizados testes microbio

lógicos; sob tais condições, o prolongado armazenamento de meios de cultura, a reduzida prática dos técnicos na realização dessas análises, a falta de precisão de equipamentos, em decorrência do longo tempo sem uso, podem constituir uma fonte de erros nos resultados analíticos.

A implantação de um bom programa de controle de qualidade analítica e a avaliação periódica do desempenho dos laboratórios são medidas imprescindíveis que visam não somente assegurar uma operação efetiva desses laboratórios, como também manter elevados o profissionalismo e a moral do pessoal, aumentando a confiança dos técnicos em seus trabalhos.

2 OBJETIVO

Esta Norma visa relacionar os itens principais relativos a equipamentos, materiais, meios de cultura e pessoal, cuja avaliação é necessária para o controle de qualidade de Laboratórios de Análises Bacteriológicas de Água e se refere às principais determinações usualmente realizadas nesses laboratórios. São apresentados, também, os itens relativos a instalações e segurança do trabalho, cuja consideração é fundamental na avaliação desses laboratórios.

3 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;
- b) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- d) L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia;
- e) L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem de material de laboratório;
- f) L5.202 - Coliformes totais e fecais - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos;
- g) L5.214 - Coliformes totais - Determinação pela técnica de membrana filtrante;
- h) L5.201 - Bactérias heterotróficas - Contagem em placas.

4 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 4.1 a 4.5.

4.1 Técnica dos tubos múltiplos

É uma técnica para cuja execução volumes decrescentes da amostra (diluições decimais consecutivas) são inoculados em um meio de cultura adequado ao microrganismo em teste, sendo que cada volume é inoculado em série de 5 tubos. Através do decréscimo dos volumes inoculados obtém-se uma diluição em que todos os tubos, ou a maioria, fornecem resultados negativos. A combinação de resultados positivos e negativos obtida é usada para calcular o número mais provável (NMP) das bactérias pesquisadas em 100 mL da amostra.

4.2 N.M.P.

Número mais provável é a estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos mediante a aplicação da técnica de tubos múltiplos.

4.3 Técnica de membrana filtrante

É uma técnica utilizada para determinar a densidade de bactérias em amostras de água, através da filtração de volumes adequados da mesma em membrana filtrante com porosidade de 0,45 μm . As bactérias a serem detectadas, apresentando dimensões maiores, ficam retidas na superfície da membrana, a qual é, então, incubada em meio de cultura adequado, à temperatura e durante o período de tempo apropriados para o desenvolvimento das bactérias pesquisadas. Formam-se, assim, colônias facilmente visualizadas, cuja contagem corresponde ao número dessas bactérias no volume filtrado.

4.4 Contagem de bactérias heterotróficas em placas

É um método utilizado para determinar a densidade de bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias facultativas em água, para cuja realização inoculam-se volumes adequados da mesma, em placas de Petri e, a seguir, adiciona-se Ágar Triptona-Glicose-Extrato de Levedura. As bactérias viáveis, que podem se desenvolver nas condições estabelecidas (nutrição, temperatura e período de incubação), formam colônias, cuja contagem corresponde à densidade bacteriana no volume inoculado da amostra.

4.5 E

Símbolo matemático que indica a somatória de vários valores.

5 APARELHAGEM

Neste item são apresentados os materiais, equipamentos, reagentes e meios de cultura requeridos para a execução dos testes relativos ao controle de qualidade.

5.1 Materiais e equipamentos

5.1.1 Alças de inoculação.

5.1.2 Autoclave.

5.1.3 Balanças de topo e analítica.

5.1.4 Banho-maria (55°C e 44,5 ± 0,2°C).

5.1.5 Bico de Bunsen.

5.1.6 Caixas de aço inoxidável de 50 cm x 30 cm x 20 cm.

5.1.7 Destilador de água ou aparelho para desionização.

5.1.8 Estantes de arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio.

5.1.9 Estufa para esterilização e secagem.

5.1.10 Equipamento para filtração.

5.1.10.1 Fonte de vácuo.

5.1.10.2 Frasco de filtração.

5.1.10.3 Frasco de proteção.

5.1.10.4 Porta-filtros.

5.1.11 Frasco para água de diluição.

5.1.12 Frasco para coleta de amostras.

5.1.13 Hastes de madeira.

5.1.14 Incubadora bacteriológica (35 ± 0,5°C).

5.1.15 Lâmpada de luz fluorescente branca (fria), para microscópio estereoscópico.

5.1.16 Materiais para preparação de meios de cultura.

5.1.17 Medidor de pH.

5.1.18 Membranas filtrantes estereis de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 µm, brancas, quadriculadas.

5.1.19 Microscópio estereoscópico binocular.

5.1.20 Pinças de aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

5.1.21 Pipetas tipo Mohr de 10 mL, 5 mL e 1 mL.

5.1.22 Placas de Petri.

5.1.22.1 De plástico não tóxico, bem vedadas, de 48 mm de diâmetro e 8,5 mm de altura.

5.1.22.2 De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade, com 15 mm de altura x 100 mm de diâmetro.

5.1.23 Provetas graduadas de 100 mL ou porta-filtros graduados.

5.1.24 Refrigerador.

5.1.25 Tampas metálicas para tubos de ensaio.

5.1.26 Tela de amianto de 22 x 22 cm.

5.1.27 Tripé.

5.1.28 Tubos de Durham de 5 mm x 40 mm e 10 mm x 75 mm.

5.1.29 Tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, de 16 mm x 150 mm e 12 mm x 120 mm.

5.1.30 Tubos de ensaio de 15 mm x 150 mm, com tampas de rosca.

5.2 Reagentes

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

- ágar;
- álcool etílico a 95%;
- azul de bromotimol;
- azul de metileno;
- casitona;
- cloreto de sódio (NaCl) p.a;
- dextrose;
- fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.;
- hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- infusão de carne bovina;
- peptamina;
- peptona de soja.
- proteose peptona;
- tioglicolato de sódio;
- triptona.

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

5.3 Meios de cultura

5.3.1 Caldo de soja e triptona

Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 7,3 \pm 0,2	

Preparo:

Para o preparo deste meio, pesar 30 g do meio desidratado "Tryptic Soy Broth" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,3.

Distribuição:

Este meio deve ser distribuído como segue:

Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de aproximadamente 12 a 13 mL de caldo de soja e triptona em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados à temperatura ambiente.

5.3.2 Meio de Brewer com Tioglicolato

Fórmula:

Infusão de carne bovina.....	500,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....	2,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Dextrose.....	5,0 g
Tioglicolato de sódio.....	0,5 g
Ágar.....	0,5 g
Azul de metileno.....	0,002 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 7,2 \pm 0,2	

Preparo:

Para o preparo desse meio, pesar 40,5 g do meio desidratado "Brewer Thioglycollate Medium" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,2.

Distribuição:

Este meio deve ser distribuído como segue:

Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de 12 a 13 mL do meio de Brewer com tioglicolato em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após autoclavação, os tubos contendo o meio preparado devem ser resfriados a 25°C e armazenados ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

Nota: Se o meio não for utilizado imediatamente após sua preparação e se em mais de 20% da parte superior de cada tubo ocorrer a mudança de coloração para verde, o mesmo não é adequado para o uso. Em tais circunstâncias, é permitido um reaquecimento do meio em banho-maria, para eliminar o oxigênio absorvido.

5.3.3 Meio fluido de SabouraudFórmula:

Casitona.....	5,0 g
Peptamina.....	5,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 5,7 ± 0,2	

Preparo:

Para o preparo desse meio, pesar 30 g do meio desidratado "Fluid Sabouraud Medium" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 5,7.

Distribuição:

Este meio deve ser distribuído como segue:

Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de 12 a 15 mL do meio fluido de Sabouraud em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampade rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados à temperatura ambiente.

5.4 Soluções

5.4.1 Solução alcoólica de fenolftaleína

Fórmula:

Fenolftaleína.....	5,0 g
Álcool etílico a 95%.....	500 mL
Água destilada.....	500 mL

Preparo:

Pesar 5,0 g de fenolftaleína e dissolver em 500 mL de álcool etílico a 95%. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente. Acrescentar 500 mL de água destilada e, a seguir, adicionar algumas gotas de uma solução de hidróxido de sódio 0,02 N (item 5.4.2), até que apareça uma coloração rosa-claro.

5.4.2 Solução de hidróxido de sódio 0,02 N

Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	0,8 g
Água destilada.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 0,8 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente.

5.4.3 Solução de azul de bromotimol a 0,04 %

Fórmula:

Azul de bromotimol.....	0,1 g
Solução de hidróxido de sódio 0,01 N (NaOH-0,01N) ..	16 mL
Água destilada q.s.p.....	250 mL

Preparo:

Pesar 0,1 g de azul de bromotimol e adicionar 16 mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 N (item 5.4.4). Diluir para 250 mL com água destilada.

5.4.4 Solução de hidróxido de sódio 0,01 N

Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	0,4 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 0,4 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

Para a avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água, alguns requisitos relativos às instalações do laboratório, à segurança do trabalho, a materiais e equipamentos, a meios de cultura e pessoal técnico são requeridos e o seu cumprimento deve ser observado. Estes requisitos estão relacionados nos itens 6.1 a 6.10.

6.1 Instalações do laboratório

O laboratório de análises bacteriológicas de água deve apresentar as características descritas nos itens 6.1.1 a 6.1.9.

6.1.1 Área suficiente para permitir o desenvolvimento dos trabalhos em períodos de máxima utilização.

6.1.2 Disponibilidade de espaço físico para armazenar meios de cultura, vidraria, reagentes e para lavagem e esterilização de materiais.

6.1.3 Localização em área limpa, protegida de correntes de ar e mudanças bruscas de temperatura.

6.1.4 Manutenção de um serviço de limpeza frequente de bancos, armários, bancadas, pisos e janelas para evitar o acúmulo de poeira e outros resíduos.

6.1.5 Temperatura ambiente mantida entre 18 e 30°C, apropriada para permitir o funcionamento adequado das incubadoras.

6.1.6 Água, gás e eletricidade devidamente instalados.

6.1.7 Piso anti-derrapante, impermeável e resistente a álcalis e ácidos; paredes de cor clara, revestidas com material liso, resistente e impermeável numa altura de, no mínimo, 2 metros.

6.1.8 Bancadas em número suficiente para atender à demanda do processamento de amostras.

6.1.9 Área de escritório isolada da área de execução das análises.

6.2 Segurança do trabalho em laboratório de análises bacteriológicas de água

Devem ser considerados os itens relativos à segurança do trabalho em laboratório de microbiologia, apresentados na Norma CETESB L5.009.

6.3 Controle de desempenho dos equipamentos

Os equipamentos utilizados em laboratórios de análises bacteriológicas de água devem atender a uma série de especificações em função de sua finalidade e, portanto, requerem cuidados especiais, sendo que, para muitos deles, impõe-se a necessidade de realização de testes-controlados periódicos com o objetivo de avaliar a efetividade de sua operação. A avaliação dos equipamentos envolve a verificação dos itens pertinentes a cada um deles.

6.3.1 Incubadora bacteriológica

6.3.1.1 Especificações

Deve ter capacidade suficiente para o trabalho diário e permitir a circulação do ar ao redor das culturas quando o material estiver sendo incubado. Deve ser equipada com termostato e manter a umidade relativa alta (75 a 85%).

6.3.1.2 Cuidados especiais

Não deve ser submetida a excessivas variações de temperatura ambiente. Periodicamente, deve ser efetuada sua manutenção preventiva.

6.3.1.3 Controle de temperatura

Deve ser feito diariamente, através da leitura dos registros efetuados, para assegurar que as variações de temperatura não ultrapassem os limites permitidos. Deve-se fazer a leitura da temperatura no mínimo duas vezes ao dia, sendo que os termômetros utilizados devem ser calibrados e apresentar, como requisito mínimo, divisões de escala de 0,5°C; devem ser colocados em vários pontos da incubadora, com o bulbo submerso em água e glicerina ou óleo mineral (mistura a 50%).

6.3.2 Banho-maria

6.3.2.1 Especificações

Deve ser equipado com termostato e um agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água, com a finalidade de manter a temperatura uniforme em todos os pontos.

6.3.2.2 Cuidados especiais

- a) Semanalmente, deve ser efetuada a lavagem do banho-maria, utilizando-se um detergente adequado;
- b) As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado plastificado, para evitar problemas de corrosão metálica;
- c) A manutenção preventiva do banho-maria deve ser realizada periodicamente.

6.3.2.3 Controle da temperatura

Deve ser feito através da leitura da temperatura, no mínimo duas vezes ao dia. Os termômetros utilizados devem ser calibrados e apresentar divisões de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$. Para o ensaio de coliformes fecais, a temperatura deve ser de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Para utilização do banho-maria para outros ensaios, a temperatura deve ser regulada, obedecendo às exigências específicas de cada um deles.

6.3.3 Autoclave

6.3.3.1 Especificações

Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método. Construída para fornecer uma temperatura uniforme de 121°C , deve ser equipada com uma válvula de segurança e um termômetro, cujo bulbo deve estar na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de 121°C dentro de, no máximo, 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

6.3.3.2 Cuidados especiais

Programas de manutenção preventiva da autoclave devem ser realizados periodicamente.

6.3.3.3 Controles:

a) Controle de temperatura:

É feito através da leitura de um termômetro calibrado, cujo bulbo deve estar na direção da linha de escape do vapor condensado:

b) Controle do tempo da operação total:

A operação total de uma autoclave deve durar, no máximo, uma hora. Para este controle, deve-se acompanhar os ci

culos de operação, efetuando-se os registros correspondentes de tempo-temperatura.

- c) Controle de tempo necessário para atingir a temperatura de esterilização:

É realizado através da verificação dos registros de tempo-temperatura correspondentes ao ciclos de operação da autoclave.

- d) Controle da eficiência na esterilização:

É feito através da utilização de bioindicadores (ver item 6.4.1) e através do teste de esterilidade de meios de cultura descrito na Norma CETESB L5.216, item 7.6.

6.3.4 Estufa para esterilização

6.3.4.1 Especificações

Deve ser equipada com um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170-180°C; sua capacidade deve ser suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado.

6.3.4.2 Cuidados especiais

Programas periódicos de manutenção preventiva devem ser obedecidos.

6.3.4.3 Controles

- a) Controle da temperatura:

Deve ser feito através da utilização de termômetros calibrados dentro de uma variação de 160-180°C. Paralelamente a esse controle, devem ser utilizadas fitas-controle, nas quais a alteração da cor em faixas determinadas indica que a temperatura de esterilização foi atingida.

- b) Controle da eficiência na esterilização de materiais:

É feito através da realização de testes de esterilidade dos materiais submetidos à esterilização. (ver item 6.4.2. Teste de esterilidade de materiais).

6.3.5 Destilador de água ou aparelho para desionização.

6.3.5.1 Especificações

O destilador de água e o tanque de armazenamento devem ser construídos de um material que não contribua para a contaminação. Todas as superfícies que entram em contacto com a água destilada devem ser

de aço inoxidável, vidro (quartzo ou pyrex) ou latão banhado com estanho, sendo que, neste último caso, deve-se tomar cuidado com o desgaste do revestimento, pois isto determinaria o contacto directo da água destilada com o latão. Os tanques de armazenamento devem ser de aço inoxidável, fibra de vidro ou plástico apropriado (por exemplo, politetrafluoroetileno), devem ter uma tampa que se ajuste perfeitamente e um filtro na entrada de ar para remover gases e vapores. Os destiladores metálicos devem ter, adaptado, um sistema de drenagem constante para evitar a formação de incrustações.

6.3.5.2 Cuidados especiais

- a) O destilador deve ser desmontado e limpo periodicamente e seu recipiente de fervura deve ser esvaziado diariamente e, posteriormente, ser cheio com água limpa;
- b) Cuidados especiais devem ser tomados para não se introduzir qualquer contaminação nos tanques de armazenamento ou em qualquer conexão associada ao destilador;
- c) As instalações de um sistema de distribuição de água destilada devem ter tubos e conexões de estanho puro, latão banhado com estanho, aço inoxidável, vidro ou plástico apropriado; o cloreto de polivinila (PVC) é uma fonte de contaminação e por isso não deve ser usado.

6.3.5.3 Controle de qualidade da água destilada produzida

É feito através da aplicação de testes biológicos e químicos relacionados na Tabela 1, com os respectivos limites e frequência de realização.

6.3.6 pHmetro

6.3.6.1 Especificações

O pHmetro deve ser dotado de um sistema eletrônico capaz de fornecer leituras directas com exatidão de $\pm 0,1$ unidade de pH.

6.3.6.2 Controle da exatidão

É feito através da utilização de soluções-padrão, tamponadas com pH = 4,0, pH = 7,0 e pH = 10,0, pelo menos duas vezes ao dia,

6.3.7 Termômetros

6.3.7.1 Especificações

Os termômetros utilizados rotineiramente no laboratório para o controle da temperatura de incubadoras, banhos-maria, autoclaves e estu

fas de esterilização, etc., devem ser calibrados e apresentar escala adequada à finalidade de seu uso. O laboratório deve possuir ou ter acesso a um órgão que possua um termômetro certificado pelo "National Bureau of Standards" (NBS) ou outro órgão equivalente.

6.3.7.2 Controle da exatidão

É feito através da verificação das temperaturas registradas pelos termômetros usados rotineiramente, tomando como padrão de comparação um termômetro certificado pelo "National Bureau of Standards" (NBS) ou outro órgão nacional equivalente. Essa verificação deve ser feita a temperaturas selecionadas, dentro de uma faixa de variação adequada ao uso a que se destina o termômetro em teste.

6.3.7.3 Cuidados especiais

A coluna de mercúrio do termômetro não deve estar seccionada, apresentando espaços de ar.

6.3.8 Balanças

6.3.8.1 Especificações

As balanças utilizadas para pesar meios de cultura devem ter capacidade de pesar 200-300 g, no mínimo, e sensibilidade de pelo menos 0,1 g ao pesar 150 g.

A balança analítica, utilizada para pesar quantidades pequenas (inferiores a 2 g), deve ter sensibilidade de pelo menos 1 mg ao pesar 10 g.

6.3.8.2 Cuidados especiais:

- a) As balanças devem estar protegidas contra vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura, devendo, portanto, ser colocadas em lugares adequados;
- b) Devem ser mantidas limpas e manejadas por pessoal que conheça seu funcionamento e manutenção;
- c) Devem ser submetidas a programas de manutenção preventiva.

6.3.8.3 Controle da sensibilidade

Deve ser realizado periodicamente, com a finalidade de verificar se são cumpridas as especificações quanto a esse item, para cada tipo de balança empregado no laboratório.

6.3.9 Contador de colônias

6.3.9.1 Especificações

Deve fornecer visibilidade satisfatória das colônias e ampliação

de 1,5 diâmetros e apresentar uma placa Wolfhügel ou um modelo equivalente, com linhas formando um quadriculado, para orientar a contagem. Preferivelmente, deve apresentar campo escuro.

TABELA 1 - Testes biológicos e químicos para controle da água destilada

Parâmetros/Unidades		Limites permissíveis	Frequência de monitoramento
Testes Microbiológicos			
Contagem de bactérias heterotróficas em placas (UFC/mL)*	Água recém-destilada	< 1000	mensal
	Água destilada estocada	< 10000	mensal
Prova de adequabilidade biológica da água destilada - razão B/A **		0,8-3,0	anual ***
Testes Químicos			
Condutividade $\mu\text{S/cm}$ a 25°C		1-2	diário
pH		5,5-7,5	diário
Carbono orgânico total (mg/L)		< 1,0	mensal
Amônia/Aminas (mg/L)		< 0,1	mensal
Cloro residual		ausente	mensal
Metais pesados (mg/L)	Cádmio	< 0,05	mensal
	Chumbo	< 0,05	
	Cobre	< 0,05	
	Cromo	< 0,05	
	Níquel	< 0,05	
	Zinco	< 0,05	
	Total	< 1,0	

* - Ver Norma Técnica L5.201

** - Ver Norma Técnica L5.215

*** - Anual ou quando da aquisição de novo destilador.

6.3.9.2 Cuidados especiais

Deve ser submetido a um programa de manutenção preventiva.

6.3.10 Porta-filtros

6.3.10.1 Especificações

Devem ser esterilizáveis e apresentar boa vedação durante a filtração. Se forem de metal, a cobertura metálica não deve estar gasta, deixando exposto o metal da base, que pode ser tóxico. Além de aço inoxidável, os porta-filtros podem ser de vidro ou plástico apropriado.

6.3.10.2 Cuidados especiais

- a) Os porta-filtros devem ser lavados pelo menos uma vez por semana, com um detergente adequado, para evitar o acúmulo de impurezas ou incrustações sobre suas paredes.
- b) Com a finalidade de evitar ranhuras, se o funil for de aço inoxidável, deverá ser mensalmente recoberto com uma camada superficial de silicone e depois polido com uma flanela macia e limpa.

6.3.10.3 Controle da esterilidade dos porta-filtros

Este controle deve ser feito antes do início e após a filtração de amostras. Para sua execução, realizar o teste descrito no item 6.4.3.

6.3.11 Membranas filtrantes

6.3.11.1 Especificações

Devem proporcionar uma completa retenção de bactérias em sua superfície e velocidade de filtração satisfatória. Devem ainda ser resistentes, livres de glicerina e não devem apresentar áreas hidrofóbicas. As dificuldades básicas encontradas com membranas filtrantes normalmente se relacionam com distribuição dos poros, presença de áreas hidrofóbicas, toxidez da tinta empregada na impressão do quadriculado em sua superfície superior e com o próprio material empregado em sua confecção. Especificações mais detalhadas são apresentadas na norma CETESB L5.214.

6.3.12 Pinças para uso na técnica de membrana filtrante

6.3.12.1 Especificações

Devem ser de modelo adequado, de preferência com extremidades arredondadas ou retas. Não devem apresentar rugosidades, pois poderão danificar as membranas filtrantes.

6.3.13 Instrumentos para inoculação

6.3.13.1 Especificações

As alças de inoculação podem ser de níquel-cromo ou platina-irídio nº 22 ou 24. Podem também ser utilizados fios de alumínio ou aço inoxidável. Devem ter 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade um aro com diâmetro mínimo de 3 mm. Para a transferência de cultura entre meios líquidos, podem ser utilizadas hastes de madeira descartáveis de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro.

6.3.14 Microscópio estereoscópico

6.3.14.1 Especificações

Deve fornecer uma ampliação de 10 a 15 diâmetros e ser utilizado com iluminação proporcionada por uma lâmpada de luz fluorescente branca (fria).

6.4 Testes para avaliar a efetividade de operação de equipamentos

O controle da eficiência de determinados equipamentos requer a realização de testes especiais. Nos itens anteriores, foi feita referência aos seguintes testes:

6.4.1 Testes de eficiência da autoclave, utilizando-se bioindicadores.

6.4.1.1 Princípio do teste

Este teste baseia-se no princípio de que, autoclavando-se suspensões de bactérias esporuladas, se o processo de esterilização for eficiente, não deve ser detectado crescimento destas bactérias após sua incubação a temperatura e tempo apropriados ao seu desenvolvimento.

6.4.1.2 Procedimento

- a) Utilizar ampolas contendo suspensão de Bacillus stearothermophilus e colocá-las na autoclave, em diferentes lugares, de tal modo que áreas críticas para a esterilização possam ser verificadas.
- b) Proceder ao processo normal de autoclavação.
- c) Após a autoclavação, retirar as ampolas contendo a suspensão de bactérias e incubá-las a 55°C durante 24-48h.
- d) Após o período determinado de incubação, verificar se houve crescimento das bactérias, o qual é visualizado através da mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas de roxa para amarela.

6.4.1.3 Resultados

Os resultados deste teste para avaliar a eficiência da autoclave são considerados satisfatórios se não for detectado crescimento de Bacillus stearothermophilus

6.4.2 Teste de esterilidade de materiais

6.4.2.1 Princípio do teste

Este teste baseia-se no princípio de que, comprovando-se a esterilidade de materiais submetidos à esterilização em estufa a 170-180°C, ou em autoclave a 121°C, demonstra-se a eficiência do desempenho destes equipamentos.

6.4.2.2 Procedimento

- a) Selecionar alguns tubos de ensaio submetidos à esterilização na estufa cuja efetividade de operação se deseja verificar, separá-los em três grupos, identificando-os como grupos A, B e C.
- b) Com todos os cuidados de assepsia, transferir volume adequado do meio de Brewer com tioglicolato para os tubos do grupo A, de caldo de soja e triptona para os tubos do grupo B, e do meio fluido de Sabouraud para os tubos do grupo C.
- c) Tamponar cada tubo dos três grupos logo após a transferência do meio correspondente. Incubar os tubos dos grupos A e B a 35°C e os do grupo C à temperatura ambiente. A incubação deve ser feita durante 48 horas a 14 dias.
- d) Após o período de incubação, efetuar a leitura de todos os tubos, considerando qualquer alteração observada nos meios de cultura como indicativa de crescimento de microorganismos.

6.4.2.3 Resultados

Os resultados deste teste são considerados satisfatórios se não for observado crescimento de microrganismos em nenhum dos tubos correspondentes aos três grupos utilizados para o teste.

6.4.3 Teste de controle da esterilidade de porta-filtros

6.4.3.1 Princípio do método

Este teste baseia-se no princípio de que, filtrando-se um volume de determinado de água de diluição, cuja esterilidade foi previamente tes

tada, através de membrana filtrante com porosidade de 0,45 μm , se não for detectado o crescimento de bactérias na superfície da membrana após sua incubação em meio de cultura adequado, isto comprova a ausência de contaminação do porta-filtro pelas bactérias, para cuja detecção se destina o ensaio para o qual este equipamento será utilizado. O meio de cultura empregado neste teste é definido em função das bactérias que serão pesquisadas: se o porta-filtro for utilizado para a determinação de coliformes totais, o meio será o "M-Endo Agar LES"; se o teste for relativo à determinação de coliformes fecais, o Agar M-FC será o meio empregado. Este teste deverá ser realizado antes e depois da execução de análises através da técnica de membrana filtrante.

6.4.3.2 Procedimento

Para a realização deste teste, o procedimento a ser seguido é o mesmo utilizado para a determinação de coliformes totais pela técnica de membrana filtrante descrito na Norma CETESB L5.214 (item 4.6.1 a 4.4.15), observando-se apenas que a amostra, neste caso, corresponderá a um volume de 100 mL de água de diluição estéril, distribuído em proveta estéril, com a abertura recoberta com papel alumínio; as especificações relativas ao meio de cultura já foram abordadas no item anterior (item 6.4.3.1).

6.4.3.3 Resultados

Os resultados deste teste são considerados satisfatórios se não for detectada a presença de colônias das bactérias pesquisadas nas placas correspondentes a cada porta-filtro testado.

6.5 Avaliação de materiais

Os materiais de vidro, metal e plástico utilizados em Laboratórios de Análises Bacteriológicas de Água devem atender a uma série de especificações em função de sua finalidade, requerem cuidados especiais relativos ao seu preparo e esterilização e, para alguns deles, impõe-se a necessidade de realização de testes específicos. A avaliação dos materiais envolve a verificação dos itens acima assinalados pertinentes a cada um deles.

6.5.1 Materiais de vidro

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro de boa qualidade. O vidro alcalino não deve ser utilizado para fins microbiológicos, pois pode liberar, na água ou no meio de cultura, substâncias que determinam alterações nos valores de pH e podem, inclusive, possibilitar

o crescimento de certas bactérias coliformes durante um armazenamento de curta duração. A ausência de alcalinidade dos materiais de vidro deve ser comprovada através da realização do teste descrito no item 6.6.1. A lavagem da vidraria deve ser realizada de acordo com as especificações apresentadas na Norma Técnica CETESB M1.001 e requer a utilização de detergentes, cuja adequação ao uso em laboratórios deve ser testada através da realização do ensaio descrito na Norma CETESB L5.011.

6.5.1.1 Pipetas

a) Especificações:

Devem ter capacidade adequada, possibilitar escoamento rápido, ser calibradas, sendo que o erro máximo permitido é de 2,5%.

b) Cuidados especiais:

Deve ser colocado um pequeno tampão de algodão na parte superior de cada pipeta, antes de sua esterilização, como medida de segurança para o operador, para evitar ingestão acidental de amostras de água contaminadas. Para evitar a ingestão de cáusticos, solventes voláteis ou outro agente perigoso qualquer, deve-se usar pera de borracha adaptada à pipeta. Deve ser utilizado papel de boa qualidade, que resista a altas temperaturas, quando se procede à esterilização das pipetas individualmente.

6.5.1.2 Placas de Petri

a) Especificações:

Devem apresentar o fundo perfeitamente plano, sem ranhuras e bolhas de ar inclusas no vidro, com 15 mm de altura e 100 mm de diâmetro.

b) Cuidados especiais:

É recomendável esterilizar e armazenar placas de Petri estéreis envoltas em folhas de papel resistente à temperatura de esterilização (papel Kraft), quando não se dispõe de estojos metálicos adequados a essa finalidade.

6.5.1.3 Tubos de ensaio

a) Especificações:

Devem apresentar volume adequado para conter o meio e a

amostra a ser inoculada. Usualmente, são utilizados tu bos de 18 x 180 mm, 16 x 150 mm e 12 x 120 mm, seleçio nados em função do ensaio no qual serão utilizados.

b) Cuidados especiais:

As tampas a serem utilizadas devem proporcionar um ajus te hermético.

6.5.1.4 Tubos de fermentação (Tubos de Durham)

a) Especificações:

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro do tubo de ensaio em cujo interior serão utilizados. Usualmente são empre gados tubos de Durham de 7 mm x 45 mm (para tubos de en saio de 16 mm x 150 mm) e de 5 mm x 40 mm (para tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm).

6.5.1.5 Frascos para coleta de amostras

a) Especificações:

Devem ter capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tam pa à prova de vazamento, de preferência tampa de rosca feita de metal ou plástico. As tampas de metal devem ser forradas com um protetor não tóxico para evitar o contac to direto entre o metal e a amostra contida no frasco. Também são aceitáveis tampas de vidro esmerilhado, desde que, antes de sua esterilização, sejam cobertas com fo lha de papel alumínio ou papel impermeável;

b) Cuidados especiais:

Quando utilizadas as tampas de vidro esmerilhado, inse rir um barbante fino ou papel entre a tampa e o gargalo, antes da esterilização, para facilitar a sua abertura durante a amostragem.

6.5.2 Materiais de metal

Em geral, o único material de metal aceitável para uso microbiolô gico é aço inoxidável. Materiais de cobre ou seus derivados não de vem ser utilizados, pois este metal é muito tóxico para as bactérias. O alumínio pode ser utilizado apenas quando não estiver em contacto direto com o meio de cultura, água de diluição ou outros materiais que possam reagir com ele.

6.5.3 Materiais de plástico

Devem ser esterilizáveis e não apresentar resíduos tóxicos.

6.5.3.1 Placas de Petri de plástico para uso na técnica de membrana filtrante

a) Especificações:

Devem apresentar 48 mm de diâmetro e 8,5 mm de altura e proporcionar boa vedação,

b) Cuidados especiais:

Embora sejam descartáveis, estas placas podem ser reutilizadas se submetidas a processos de lavagem e esterilização adequados (Ver Norma CETESB M1.001).

6.5.3.2 Frascos para coleta de amostras

a) Especificações:

Devem ser de polipropileno ou policarbonato, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa de rosca à prova de vazamento.

b) Cuidados especiais:

É importante que os frascos ou tampas de plástico não liberem substâncias tóxicas ou nutritivas na amostra.

c) Controles:

Para assegurar a ausência de substâncias tóxicas ou nutritivas, deve ser realizada a prova de adequabilidade biológica da água destilada, descrita na Norma CETESB L5.215, procedendo da seguinte forma: deixar o material de plástico a ser testado em contacto com a água destilada estéril durante 24 horas e posteriormente analisar a água com a finalidade de determinar a presença dessas substâncias, efetuando a prova de adequabilidade biológica.

6.6 Testes para avaliação de materiais

O controle da qualidade de certos materiais envolve a realização de testes especiais. Nos itens anteriores, foi feita referência ao seguinte teste:

6.6.1 Teste para verificar a alcalinidade da vidraria

6.6.1.1 Princípio do método

Este teste baseia-se no princípio de que se o material de vidro testado liberar resíduos alcalinos, isto pode ser detectado através da utilização de um indicador de pH adequado.

6.6.1.2 Procedimento

- a) Colocar água destilada em frascos ou tubos selecionados para o teste.
- b) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- c) Após a autoclavação e posterior resfriamento da água destilada contida nos tubos ou frascos, adicionar algumas gotas de solução alcóolica de fenolftaleína (item 5.4.1).
- d) Efetuar a leitura, considerando a viragem do indicador para rosa como indicação da alcalinidade do vidro.

6.6.1.3 Resultados

Os resultados deste teste são satisfatórios se for comprovada a ausência de alcalinidade do vidro.

6.6.2 Teste para verificação de pH

6.6.2.1 Princípio do método

Este teste tem como objetivo verificar a limpeza da vidraria após o processo de lavagem, quanto à presença de resíduos ácidos ou alcalinos.

6.6.2.2 Procedimento

- a) Separar tubos de ensaio, placas de Petri, frascos e/ou outros materiais de vidro, após a lavagem.
- b) Adicionar algumas gotas de uma solução de azul de bromo timol a 0,04% (item 5.4.3).
- c) Efetuar a leitura, considerando a viragem do indicador para amarelo como indicação da presença de resíduos ácidos e, para azul, como indicação da presença de resíduos alcalinos.

6.6.2.3 Resultados

Os resultados deste teste são satisfatórios se for comprovada a ausência de resíduos ácidos ou alcalinos.

6.7 Avaliação da qualidade de meios de cultura

Esta avaliação deve ser baseada na verificação do cumprimento das especificações relativas ao Controle de Qualidade de Meios de Cultura apresentadas na Norma CETESB L5.216.

6.8 Avaliação da qualidade do trabalho do pessoal técnico

A qualidade do trabalho do pessoal envolvido na execução de análises é um item fundamental para a obtenção de dados confiáveis em laboratórios de Análises Bacteriológicas de Água e por isso deve ser avaliada periodicamente. São os seguintes os testes recomendados para essa avaliação:

6.8.1 Teste relativo à contagem de colônias de bactérias

Este é relativo às contagens de colônias de coliformes totais ou fecais pela técnica de membrana filtrante e para a contagem padrão em placas e deve ser efetuado no mínimo uma vez por mês. Para sua execução, a partir de uma amostra submetida aos ensaios relativos às determinações especificadas acima, cada analista deve efetuar a contagem das colônias que se desenvolverem. A diferença entre a contagem efetuada por cada analista e uma contagem-padrão, realizada por um analista com real experiência, não deve exceder a 10%.

6.8.2 Teste relativo à identificação de colônias típicas de coliformes (Técnica de membrana filtrante)

Mensalmente, cada analista deve efetuar a verificação de um mínimo de 50 colônias típicas de coliformes em "M-Endo Agar LES". Essa verificação é feita através da transferência de cada uma destas colônias para Caldo Lactosado e, após incubação a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48h, efetua-se a transferência de um inóculo de cada cultura que produziu gás nesse meio de cultura para um tubo correspondente contendo Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile 2%. A comparação entre o nº de colônias identificadas como típicas na contagem em "M-Endo Agar LES" e o nº de colônias que apresentaram resultado positivo no teste de verificação em Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile a 2% (produção de gás), permite calcular a precisão de cada analista, expressa em porcentagem de acertos. O lançamento em gráficos dos resultados mensais, obtidos para cada analista durante todo o ano, permite ao técnico acompanhar o seu desenvolvimento e a comparação com os resultados obtidos por outros analistas pode atuar como um estímulo para sua melhoria.

6.8.3 Teste relativo à determinação de coliformes totais ou fecais, pela técnica de membrana filtrante, em função do critério de preci

são estabelecido no laboratório.

6.8.3.1 Estabelecimento do critério de precisão

É realizado a partir de 15 amostras de rotina, em duplicata, nas quais testes prévios evidenciaram a presença de coliformes. Cada analista envolvido na execução da determinação de coliformes totais através da técnica de membrana filtrante deverá analisar uma ou mais amostras, sempre em duplicata, de tal modo que seja obtido o total de 15 amostras (em duplicata) necessário ao estabelecimento do critério de precisão do laboratório. A análise estatística dos dados correspondentes a esse conjunto de amostras, em relação às contagens obtidas para cada amostra, permite estabelecer o critério de precisão a ser utilizado nas verificações futuras da precisão dos analistas.

A análise estatística é realizada calculando-se os logaritmos (L_1 e L_2) dos resultados correspondentes às contagens (C_1 e C_2) relativas a cada amostra (observação: se uma ou ambas as contagens apresentarem resultado igual a zero, adicionar uma unidade aos dois valores obtidos). Calcular a diferença entre os logaritmos das contagens relativas a cada amostra ($\log R$) e, a seguir a média aritmética dessas diferenças (\bar{R}). O critério de precisão será correspondente ao produto do coeficiente 3,27 pelo valor obtido para \bar{R} . Considere-se o seguinte exemplo:

A Tabela 2 nos fornece dados relativos às amostras analisadas para o estabelecimento do critério de precisão.

TABELA 2 - Dados relativos às amostras analisadas no estabelecimento do critério de precisão

Amostra	Contagens		Log das contagens		Log R diferença entre os log L_1 e L_2
	C_1	C_2	L_1	L_2	
1	89	71	1,9494	1,8513	0,0981
2	38	34	1,5798	1,5315	0,0483
3	58	67	1,7634	1,8261	0,0627
.
.
.
14	7	6	0,8451	0,7782	0,0669
15	110	121	2,0414	2,0828	0,0414

Cálculos:

1) Calcular a soma das diferenças entre os logaritmos das contagens correspondentes às amostras analisadas:

$$\begin{aligned} \sum \log R &= 0,0981 + 0,0483 + 0,0627 + \dots + 0,0669 + 0,0414 = \\ &= 0,71889 \end{aligned}$$

2) Calcular a média aritmética (\bar{R}) das diferenças entre os logaritmos das contagens correspondentes às amostras analisadas:

$$\bar{R} = \frac{\log R}{n} = \frac{0,71889}{15} = 0,0479$$

R = média aritmética das diferenças entre os logaritmos das contagens

n = número de amostras.

3) Calcular o critério de precisão, multiplicando o valor obtido para \bar{R} pelo coeficiente 3,27.

$$\text{Critério de precisão} = 3,27 \times \bar{R} = 3,27 \times 0,0479 = 0,1567$$

6.8.3.2 Verificação mensal em função do critério estabelecido

Uma vez estabelecido o critério de precisão (item 6.8.3.1), realizar mensalmente a determinação de coliformes totais ou fecais em 15 amostras de rotina, em duplicata, conforme descrito no item anterior e submeter os dados obtidos ao mesmo tratamento. Comparar a média das diferenças obtida para as 15 amostras analisadas em cada mês com a média das diferenças obtidas com os dados relativos ao estabelecimento do critério de precisão. Se a diferença entre essas médias for superior ao critério de precisão determinado, a precisão dos analistas está fora de controle e isso impõe a necessidade de serem verificadas as causas que estão determinando a ocorrência de erros nessas análises.

6.8.3.3 Avaliação diária em função do critério estabelecido

Consiste em verificar diariamente os resultados das contagens em duplicata de, no mínimo, uma amostra de rotina, calcular a diferença entre o logaritmo dos mesmos, classificando como aceitáveis os resultados para os quais essa diferença é igual ou inferior ao critério de precisão.

Exemplo: Critério de precisão estabelecido: 0,1567 (Vide Tabela 3).

6.8.4 Comparação dos resultados obtidos para a mesma amostra por diferentes analistas

Mensalmente, no mínimo uma amostra que contenha coliformes deve ser selecionada para ser analisada em duplicata por diferentes analistas, com a finalidade de verificar se resultados comparáveis são obtidos.

TABELA 3 - Resultados das contagens em duplicata e estabelecimento da classificação dos resultados

Data da análise	Nome do analista	Contagens		Log das Contagens		Diferença entre os $\log(\log R)$	Classificação dos resultados
		C ₁	C ₂	L ₁	L ₂		
10/6	A.M.	71	65	0,85	0,81	0,04	aceitável
11/6	S.C.G.	110	121	0,04	1,08	0,04	aceitável
12/6	L.Y.A.	112	187	2,05	2,27	0,22	não aceitável

6.9 Avaliação das técnicas empregadas no laboratório

6.9.1 Avaliação da eficiência da técnica de tubos múltiplos

Essa avaliação é feita através da análise mensal das combinações dos resultados positivos obtidos para o cálculo do N.M.P., em análises realizadas pela técnica de tubos múltiplos. Para essa análise utiliza-se a Tabela 4, onde são apresentadas as combinações dos resultados positivos, bem como a porcentagem esperada para cada tipo de combinação. Na análise mensal a ser realizada no laboratório, classificar as combinações de resultados positivos obtidos em grupos A, B, C e D, sendo as seguintes porcentagens esperadas:

- . Grupo A: combinações esperadas em 67,5% ou mais das amostras.
- . Grupo B: combinações esperadas em 23,6% ou menos das amostras.
- . Grupo C: combinações esperadas em 7,9% ou menos das amostras.
- . Grupo D: combinações esperadas em 1% ou menos das amostras.

Notas: a) As combinações dos grupos C e D são consideradas anômalas e suas ocorrências evidenciam a presença de falhas na realização desta técnica.

- b) Esta avaliação deve ser feita a partir de, no mínimo, 50 resultados.

6.10 Recursos administrativos: documentação

Em relação ao setor de administração interna do laboratório, a documentação de todos os procedimentos analíticos deve ser verificada. Esses documentos sobre a metodologia deverão apresentar descrição detalhada, sem margem de dúvidas e estar prontamente disponíveis para o pessoal técnico. Deve-se verificar se esses procedimentos atendem a um programa de revisão periódica a curtos intervalos de tempo, pois alguns têm tendência de sofrer uma evolução com o tempo e modificações poderão ser necessárias. O laboratório deverá ter um sistema de registros onde qualquer modificação que possa interferir na metodologia seja relatada e documentada.

Em relação ao armazenamento de dados, o laboratório deverá ter um registro, de fácil manuseio, de todas as informações relativas às análises efetuadas, tais como data, origem, metodologia da análises, amostragem, nome do coletor, etc.

/TABELA 4

TABELA 4 - Classificações de combinações de NMP

Grupo A: $\geq 67,5\%$	Grupo B: $\leq 23,6\%$	Grupo C: $\leq 7,9\%$
000		001 010 020
100	110	101 120
200	210	201 211 220
300	310	301 311 320 330
400	410 420	401 411 421 430 431 440
500 510 520 530 540 550 551 552 553 554 555	511 521 531 541 542	501 502 522 532 533 543 544
		Grupo D: $\leq 1,0\%$
		Todos os outros códigos

REVOGADA

ANEXO A - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985. p. 827-1038.
- A-2 BARRY, A.L. Quality control in bacteriology through media monitoring. Am. Jour. Med. Tech., 33 (5): 387-393, 1967.
- A-3 BLACK, W.A.; DORSE, S.E. & WHITBY, J.L. A regional quality control program in microbiology. Am. Jour. Clin. Path., 66: 401-406, 1967.
- A-4 BORDNER, R. & WINTER, J. (ed.). Microbiological methods for monitoring the environment: water and waste. U.S. Environmental Protection Agency, 1978. 337 p. (EPA - 600/8-78-017).
- A-5 BRANSON, D. Problems and errors in clinical microbiology laboratory Am. Jour. Med. Tech., 32 (6): 349-357, 1966.
- A-6 CADA, R.L. Proficiency test specimens for water bacteriology. Applied Microbiology, 29 (2): 255-259, 1975.
- A-7 CETESB. Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de análises de água. São Paulo, 1978. 81 p.
- A-8 Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. 1ª rev. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- A-9 Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. 1ª rev. São Paulo, 1985. (Norma Técnica L5.215).
- A-10 Bactérias heterotróficas - Contagem em placas. 1ª rev. São Paulo, 1986. (Norma Técnica L5.201).
- A-11 Controle de qualidade de meios de cultura. 1ª rev. São Paulo, 1987. (Norma Técnica L5.216).
- A-12 Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1978. (Norma Técnica L5.009).
- A-13 Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem de material de laboratório. São Paulo, 1978. (Norma Técnica L5.011).
- A-14 Coliformes totais e fecais - Determinação do número

mais provável pela técnica de tubos múltiplos. 1ª rev.
São Paulo, 1984. (Norma Técnica L5.202).

- A-15 Coliformes totais - Determinação pela técnica de membrana filtrante. 1ª rev. São Paulo, 1984 (Norma Técnica L5.214).
- A-16 MANUAL DIFCO. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiologia. 10 ed. Michigan, Difco Laboratories, 1984.
- A-17 GRAY, R.D. & LOWE, G.H. The preparation of simulated water samples for the purpose of bacteriological quality. Jour. Hyg., 76: 49-56, 1976.
- A-18 GELDREICH, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2 ed. U.S. Environmental Protection Agency, 1975. (EPA-670/9-75-006).
- A-19 Laboratory certification and quality control for production of reliable data. Presented in the seminar on "Microbiological Indicators of Pollution and Health Hazards". São Paulo, 1978.
- A-20 MARTINS, M.T. Pre-condições para o controle de qualidade analítica. São Paulo, CETESB, 1978, 7 p. Conferência proferida no Simpósio sobre Planejamento, Instalações e Administração de Laboratórios. São Paulo, 12-13 de junho de 1978.
- A-21 MARTINS, M.T.; SANCHEZ, P.S. & ALVES, M.N. Controle de qualidade de laboratórios de análises bacteriológicas da água. X Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental promovido pela Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, Seção do Amazonas - Manaus, 1979.
- A-22 PACHECO, M.G. La evaluación de los laboratorios de salud pública. Época, 11 (5): 657-659, 1969.
- A-23 SMITH, J.P. & SANDLING, C. Quality control in bacteriology. Am. Jour. Med. Tech., 35 (9): 531-539, 1969.
- A-24 STOKES, E.J. & WHITBY, J.L. Quality control in bacteriology: preliminary trials. Am. Jour. Clin. Path., 24: 790-797, 1971.