



# NORMA TÉCNICA

L5.207

Nov/1988  
20 PÁGINAS

Bactérias heterotróficas que precipitam o ferro - contagem:  
método de ensaio

RENOVAGADA

CETESB	<b>BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS QUE PRECIPITAM</b> <b>O FERRO – CONTAGEM</b> Método de ensaio	L5.207 NOV/88
--------	---	------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	3
5 Execução do ensaio.....	9
6 Resultados.....	14
Anexo A - Recomendações de ordem geral.....	15
Anexo B - Referências bibliográficas.....	19

### INTRUDUÇÃO

As bactérias, comumente chamadas de "bactérias do ferro",constituem um grupo morfológico e fisiologicamente heterogêneo com algumas espécies de difícil cultivo em laboratório, e que apresentam um interesse especial na microbiologia da água, pois podem causar alterações em sua qualidade. Seu crescimento e desenvolvimento em larga escala em sistemas de distribuição, se manifesta através da turvação e alteração da água; podem causar odor e sabor desagradáveis e, também, estão associados com a tuberculização e corrosão de tubulações, reduzindo ou impedindo o fluxo hídrico.

Este grupo inclui tanto microrganismos quimiolitotróficos como quimiorganotróficos. Entre os quimiolitotróficos, podemos citar as bactérias filamentosas que compreendem os gêneros Leptothrix,Crenothrix e Sphaerotillus, caracterizados pelo arranjo filamentoso de suas células, envoltas por uma bainha, e o gênero Gallionella constituído de bactérias unicelulares, reniformes ou incurvadas que segregam um filamento longo (apêndice), em forma de fita entrelaçadas, a partir do hidróxido férrico depositado na célula. Estas bactérias obtêm energia a partir da oxidação do íon ferroso a íon férrico e depositam o hidróxido férrico ( $Fe(OH)_3$ ) em suas secreções mucilaginosas. Entre os microrganismos quimiorganotróficos estão as bactérias precipitadoras do ferro, que não oxidam o ferro mas podem, indiretamente, causar sua deposição. Estas bactérias obtêm energia a partir da oxidação de sais orgânicos de ferro, liberando este íon,que se precipita na forma de hidróxido férrico. Embora quando comparadas, às

bactérias filamentosas, à produção de hidróxido férrico seja menor, estas bactérias heterotróficas também estão implicadas na alteração das qualidades organolépticas da água e problemas de corrosão em tubulações.

As bactérias precipitadoras do ferro são abundantes no solo, mas também podem ser encontradas em águas de poços, lagos e rios, e os gêneros mais representativos são Enterobacter, Pseudomonas, Bacillus, Serratia e Corynebacterium. Estas bactérias, são normalmente quantificadas através de contagem em placas, pela técnica de "pour plate" utilizando-se um meio específico, contendo um sal orgânico de ferro, que fornecerá colônias ferruginosas características.

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para determinação da densidade de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro na água pela técnica de "pour plate", que é um instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

- a) avaliação das condições de proteção de poços, fontes, reservatórios e sistemas de distribuição de água para consumo humano;
- b) avaliação da eficiência das diversas etapas de operação de estações de tratamento de água na remoção destas bactérias;
- c) estimativa da biomassa de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro presentes em corpos d'água;
- d) prevenção e determinação das possíveis causas de deterioração da qualidade da água associadas com a tuberculização e corrosão de tubulações.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura
- Guia de orientação para coleta e preservação de amostras (CETESB).

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições 3.1 a 3.8.

### 3.1 Bactérias heterotróficas

São bactérias que requerem compostos orgânicos, que não o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), para a síntese de seu protoplasto.

### 3.2 Bactérias quimiolitotróficas

São bactérias que obtém energia a partir de compostos inorgânicos e utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono.

### 3.3 Bactérias quimiorganotróficas

São bactérias que obtém energia e carbono a partir de compostos orgânicos.

### 3.4 Densidade bacteriana

Número de unidades formadoras de colônias de bactérias por unidade de volume (UFC/mL).

### 3.5 Técnica de "pour plate"

Técnica que consiste na adição do meio de cultura em estado líquido ao inóculo da amostra, sendo requerida a estabilização da temperatura do mesmo na faixa de  $44-46^\circ\text{C}$  antes dessa adição, para evitar a solidificação do mesmo, devido à presença de ágar em sua composição.

### 3.6 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

### 3.7 p.a.

Para análise.

### 3.8 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

## 4 APARELHAGEM

### 4.1 Equipamentos

#### 4.1.1 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de  $121,6^\circ\text{C}$ , ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na

câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

#### 4.1.2 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

#### 4.1.3 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

#### 4.1.4 Bico de Bunsen

Com funcionamento adequado para permitir uma combustão completa.

#### 4.1.5 Contador de colônias

Tipo Quebec ou similar, preferencialmente com campo escuro, ou outro modelo que forneça aumento equivalente (1,5 diâmetros) e possibilite visualização satisfatória das colônias de bactérias a serem contadas.

#### 4.1.6 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana.

#### 4.1.7 Estufa para esterilização e secagem

Deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170°C a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, a uma temperatura de 170°C a 180°C.

#### 4.1.8 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura, em todas as partes utilizadas, seja a requerida para os testes: 25 a 28°C. Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material

de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deve manter 75% a 85% de umidade relativa e ser colocada onde a temperatura permaneça na faixa de 16°C a 27°C.

#### 4.1.9 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH = 4,0; pH = 6,86 e pH = 9,18.

#### 4.1.10 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2°C a 8°C, com capacidade para conter os meios de cultura e soluções a serem mantidos sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção deve ser feitas periodicamente.

### 4.2 Materiais

#### 4.2.1 Frascos erlenmeyer

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro.

#### 4.2.2 Frascos para coleta de amostras

De vidro neutro ou plástico autoclavável não tóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

#### 4.2.3 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

#### 4.2.4 Materiais para preparação de meios de cultura

Recipientes de vidro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

#### 4.2.5 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 mL e 10 mL, com graduação de 1/10, com bocal para tampão de algodão, com erro de calibração inferior a 2,5%. São guardadas em caixas de aço inoxidável. Podem também ser embrulhadas

individualmente em papel. Esterilizadas em calor seco a 170-180°C , durante duas horas.

#### 4.2.6 Placas de Petri

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras e bolhas de ar, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

#### 4.2.7 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter 12 a 15 mL do meio de cultura (usualmente são empregados dos tubos de ensaio de 15 mm x 150 mm).

### 4.3 Reagentes

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

- ácido etilendiaminotetracético, sal dissódico (EDTA);
- ágar;
- citrato férrico amoniacal (vermelho);
- cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.;
- fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) p.a.;
- fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a.;
- hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) p.a.;
- sulfato de amônio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] p.a.;
- sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.;
- tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) p.a.

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

### 4.4 Meios de cultura

#### 4.4.1 Ágar citrato férrico amoniacal

Fórmula:

Sulfato de amônio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ].....	0,5 g
Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ).....	0,5 g
Fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	0,5 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,5 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,2 g
Citrato férrico amoniacal.....	10,0 g

Ágar..... 15,0 g  
 Água destilada..... 1 000,0 mL  
 pH final após esterilização:  $6,7 \pm 0,1$

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1 N). Distribuir volumes de 12 a 15 mL em tubos de 15 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente durante o período máximo de 4 semanas, fora do alcance da luz.

4.5 Soluções

4.5.1 Água de diluição

Fórmula:

Solução estoque A..... 1,25 mL  
 Solução estoque B..... 5,00 mL  
 Água destilada..... 1 000,00 mL  
 pH final após esterilização:  $7,2 \pm 0,1$

4.5.1.1 Fórmula da solução estoque A

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a..... 34,0 g  
 Água destilada q.s.p..... 1 000,0 mL

4.5.1.2 Preparo da solução estoque A

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para  $7,2 \pm 0,1$  com solução de hidróxido de sódio e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Armazenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

4.5.1.3 Fórmula da solução estoque B

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) p.a..... 81,1 g  
 Água destilada q.s.p..... 1 000,0 mL

4.5.1.4 Preparo da solução estoque B

Pesar 81,1 g de cloreto de magnésio, colocar em um balão volumétrico. Acrescentar um pequeno volume de água destilada e, após dissolu



ção, completar o volume para 1 000 mL. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Armazenar a 4°C.

#### 4.5.1.5 Preparo final da água de diluição

Adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a 1 000 mL de água destilada. Distribuir em frascos de diluição quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a 121°C durante 15 minutos, volumes de  $90 \pm 2$  mL. Armazenar à temperatura ambiente.

Nota: Antes da utilização da solução estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

#### 4.5.2 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N

##### Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

##### Preparo:

Pesar 40 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 hidróxido de sódio.

#### 4.5.3 Solução de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a 1,8%

##### Fórmula:

Tiosulfato de sódio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) p.a.....	18,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

##### Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico e dissolver em pequenos volumes de água e, após dissolução, completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Armazenar em frascos bem vedados.

Nota: Ao serem preparados os frascos para coleta de amostras de águas tratadas, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,1 mL dessa solução para cada 100 mL de amostra a ser coletada.

#### 4.5.4 Solução de EDTA a 15%

##### Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico).... 150 g  
Água destilada q.s.p..... 1 000 mL

##### Preparo:

Pesar 150 g de EDTA, colocar em um balão volumétrico e dissolver em um pequeno volume de água e, após dissolução, completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Armazenar em frascos bem vedados.

Nota: Ao serem preparados os frascos para coleta de amostras de águas suspeitas de conterem metais pesados, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,3 mL dessa solução para cada 100 mL da amostra a ser coletada. Além da solução de EDTA, deve ser adicionado aos frascos de coleta dessas amostras, 0,1 mL de uma solução de tiosulfato de sódio a 10% para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

## 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 5.1 Princípio do método

A determinação da densidade de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro em uma amostra baseia-se no princípio de que, definindo condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, se houver bactérias viáveis na água, que possam se desenvolver nas condições estabelecidas, haverá formação de colônias típicas que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para isso, volumes adequados da amostra são inoculados em placas de Petri com posterior adição do meio de cultura fundido, ágar citrato férrico amoniacal (técnica de "pour plate"). Após o período determinado de incubação, é feita a contagem das unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro com auxílio de um contador tipo Quebec ou similar.

### 5.2 Reações no meio de ágar citrato férrico amoniacal

Neste meio, as bactérias heterotróficas utilizam o citrato como fonte de carbono e energia, ocorrendo a liberação do íon férrico, o qual se precipita na forma de hidróxido férrico, o que confere às colônias uma coloração ferruginosa característica.

### 5.3 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Orientação para Coleta e Preservação das Amostras (CETESB).

#### 5.3.1 Amostra

##### 5.3.1.1 Identificação

A amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

##### 5.3.1.2 Agente neutralizador de cloro residual

Para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

##### 5.3.1.3 Agentes quelantes

Para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc. deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

##### 5.3.1.4 Transporte e conservação

Após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e o início

do exame não deve exceder a 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder a 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

#### 5.4 Procedimento

5.4.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.4.2 Preparar placas de Petri em duplicata para cada volume da amostra a ser inoculado e proceder à identificação das mesmas, anotando, na tampa de cada placa, o número designado pelo laboratório para a amostra, o volume a ser inoculado, a data e o tipo de água.

5.4.3 Homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45°C entre o braço e o antebraço. Para essa finalidade pode ser utilizado também um homogeneizador mecânico.

5.4.4 Com uma pipeta estéril de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir volumes em duplicata de 1 mL da amostra para as placas de Petri, previamente identificadas.

5.4.5 Quando for necessário examinar volumes decimais inferiores a 1 mL da amostra, preparar as diluições da seguinte maneira:

- a) homogeneizar a amostra (como em 5.4.3) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 mL da amostra;
- b) repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente ( $10^{-1}$ ) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, transferir 10 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra;
- c) proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , ..... $10^{-8}$ .....).

5.4.6 Homogeneizar o conteúdo do frasco com a diluição desejada (como em 5.4.3) e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 1 mL para cada uma das duas placas correspondentes.

5.4.7 Após a inoculação de todos os volumes requeridos da amostra e num espaço de tempo inferior a 20 minutos, entreabrir cada placa e acrescentar 12 a 15 mL de ágar citrato férrico amoniacal (previamente fundido e mantido em banho-maria para estabilização da temperatura a 44-46°C), tendo o cuidado de flambar a boca do tubo antes de verter o meio de cultura na placa.

5.4.8 Homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contidos na placa com movimentos circulares em forma de oito (∞), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o meio de cultura com o inóculo contra as paredes ou na tampa da placa. Deixar o meio de cultura solidificar.

5.4.9 Incubar as placas a 25-28°C durante 10 dias, em posição invertida, para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio de cultura.

5.4.10 Após o período de incubação, selecionar para a leitura as placas em duplicata, correspondentes ao volume inoculado que tenha fornecido contagem entre 30 a 300 colônias de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro (colônias ferroginosas) e, com auxílio de um contador de colônias, efetuar a contagem nessas duas placas (quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens inferiores a 30, efetuar a contagem nas placas correspondentes de maior volume). Calcular a média aritmética das contagens e multiplicar o resultado pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

5.4.10.1 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, há 2 casos a considerar:

- a) quando o menor volume inoculado fornece contagens próximas a 300:

Neste caso, efetuar as contagens nas duas placas correspondentes a esse volume. Calcular a média aritmética das contagens e multiplicar o resultado pelo inverso da diluição utilizada nas placas;

- b) quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens muito superiores a 300, proceder conforme um dos seguintes casos:

- placas com menos de 10 colônias por cm<sup>2</sup>: efetuar as contagens em 13 cm<sup>2</sup> (13 quadrados do contador de colônias), que apresentem distribuição representativa

de colônias, em cada uma das placas em duplicata correspondentes ao volume selecionado para a contagem. Multiplicar a soma das contagens de cada placa por 5 (quando a área da placa for de  $65 \text{ cm}^2$ ). Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

Nota: Se possível, selecionar, para essa contagem, sete quadrados consecutivos horizontalmente e seis quadrados consecutivos verticalmente, tomando cuidado para não contar o mesmo quadrado duas vezes.

- placas com 10 a 100 colônias por  $\text{cm}^2$ : efetuar a contagem em 4 quadrados representativos ( $4 \text{ cm}^2$ ) em cada uma das placas em duplicata selecionadas para leitura. Calcular a média aritmética das contagens por  $\text{cm}^2$  para cada placa e multiplicar cada resultado pela área da placa em  $\text{cm}^2$  (usualmente 65). Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

Nota: O fator utilizado normalmente para placas de vidro é 65 e para as placas de plástico é 67.

- placas com mais de 100 colônias por  $\text{cm}^2$ : relatar o resultado como  $> 6\ 500$ , multiplicado pelo inverso do menor volume calculado.

5.4.10.2 Quando os resultados finais obtidos forem superiores a 100 efetuar o arredondamento (de tal modo que o resultado final apresente apenas 2 algarismos significativos) segundo as seguintes regras:

a) Valores de 101 a 1 000

- quando o algarismo das unidades for igual ou superior a 5, somar uma unidade ao algarismo das dezenas.

Exemplo: 145 é expresso como 150.

- quando o algarismo das unidades for inferior a 5, considerá-lo como zero. Exemplo: 142 é expresso como 140.

b) Valores superiores a 1 000

Considerar zero para o algarismo das unidades e efetuar o arredondamento das dezenas da seguinte forma:

- quando o algarismo das dezenas for igual ou superior a 5, somar uma unidade ao algarismo da centena. Exemplo: 1 351 é expresso como 1 400.

- quando o algarismo das dezenas for inferior a 5, considerá-lo como zero. Exemplo: 1 348 é expresso como 1 300.

## 6 RESULTADOS

6.1 Expressar o resultado em termos de unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro por mililitro (UFC/mL).

6.1.1 Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados não apresentarem colônias, expressar o resultado como <1 multiplicado pelo inverso do maior volume inoculado (Exemplo: para uma amostra, cujo maior volume inoculado foi 0,01 mL e não se observou crescimento em nenhuma das placas, o resultado é expresso como <100 UFC/mL).

- Nota:
- a) No caso previsto em 5.4.10.1, alínea a, expressar o resultado como "contagem estimada".
  - b) Quando as placas não puderem ser contadas devido a erros nas diluições, quebra acidental das amostras ou quando se observarem evidências de contaminação, relatar o resultado como: "análise prejudicada devido a acidente de laboratório".

6.2 Do relatório deve constar no mínimo:

- a) local e datas de coleta e análise;
- b) caracterização completa da amostra (tipo de água, cloro residual, temperatura, etc.);
- c) nome do coletor da amostra;
- d) resultado do ensaio, expresso conforme 6.1;
- e) código desta Norma e técnica utilizada; e
- f) nome e assinatura do responsável pela análise.

---

/ANEXO A

ANEXO A - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALA-1 Esterilização das soluções e meios de cultura - autoclavação

A esterilização de soluções ou dos meios de cultura em autoclave deve ser feita em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

A-2 Controle de esterilidade das soluções e meios de cultura

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura devem ser testados quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.

A-3 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.001.

A-4 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24 a 48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-5 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar a sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de ensaios específicos. Ver Norma CETESB L5.215.

A-6 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meio de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens, em local fresco e seco, protegidos da luz. Em laboratórios não equipados com ar condicionado, o armazena



mento dos meios desidratados deve ser efetuado colocando-se os frascos de boca para baixo; isto produz um efeito de selagem conveniente ao redor da tampa de rosca, que retardará a decomposição do meio.

#### A-7 Cuidados no preparo dos meios de cultura

A-7.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quando à cor, odor e consistência e, principalmente, não se apresentarem endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes, para que não liberem substâncias, tais como cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio.

A-7.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água destilada fria, principalmente para os meios que contém ágar, pois, se for utilizada água quente, forma-se imediatamente em torno de cada partícula de ágar uma película que protege o núcleo. Com a elevação da temperatura, ocorre um aquecimento seco do núcleo, que impede que a partícula se umedeça totalmente. Por esse motivo, aconselha-se deixar os meios que contenham ágar macerando durante 15 minutos em água destilada fria, agitando-se a mistura frequentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

#### A-8 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle de qualidade dos meios de cultura a serem empregados no teste para determinação da contagem de bactérias heterotróficas que precipitam o ferro. Ver Norma CETESB L5.216.

#### A-9 Precauções

A-9.1 Ao fundir o meio de cultura ágar citrato férrico amoniacal evitar:

- a) colocar excesso de água no recipiente que irá conter os tubos com o meio de cultura, pois essa, ao ferver, poderá ocasionalmente entrar nos tubos, contaminando o meio;
- b) exposição prolongada a temperaturas elevadas durante e após a fusão.

A-9.2 Durante a estabilização da temperatura do meio de cultura, evitar que a temperatura do banho-maria exceda 46°C, pois algumas

bactérias mais sensíveis poderão ser mortas, quando se adiciona o meio sobre o inóculo da amostra.

---

/ANEXO B

REVOGADA

REVOGADA

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sydney, 1967.
- B-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16ª ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985, p. 827-1038.
- B-3 CLARK, F.M.; SCOTT, R.M. & BONE, E. Heterotrophic iron-precipitating bacteria. Journal American Water Works Association, 59: 1036-1042, 1967.
- B-4 CETESB. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1986, 1ª rev. (Norma Técnica M1.001).
- B-5 \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979, (Norma Técnica L5.216).
- B-6 \_\_\_\_\_. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985, 1ª rev. (Norma Técnica L5.215).
- B-7 \_\_\_\_\_. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978 (Norma Técnica L5.010).
- B-8 \_\_\_\_\_. Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, 1ª ed., 1988, 150 p.
- B-9 CULLIMORE, D.R. & McCANN, A.E. The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. In: SKINNER, F.A. & SHEWAN, J.M. Aquatic Microbiology. London, Academic Press, 1977. p. 219-257 (The Society for Applied Bacteriology Symposium Series: 6).
- B-10 FARQUHAR, G.H. & BOYLE, W.C. Identification of filamentous microorganisms in activated sludge. Journal Water Pollution Control Federation, 43: 604-622, 1971.

- B-11 SMITH, S.A. The "iron bacteria" problem: its causes, prevention and treatment in water wells. Michigan, ASAE, 1983, 12 p. (ASAE Paper; 83 - 2531).
- B-12 STARKEY, R.L. Transformation of iron by bacteria in water. Journal American Water Works Association, 37 (10): 963-984, 1945.
- B-13 WOLFE, R.S. Cultivation, morphology, and classification of the iron bacteria. Journal American Water Works Association, 50: 1241-1249, 1958.

RENOGADA