



NORMA TÉCNICA

L5.209

Set/1995
18 PÁGINAS

Contagem de colônias de bactérias que oxidam manganês:
método de ensaio

RENOVADA

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	CONTAGEM DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS QUE OXIDAM O MANGANÊS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DOÇES	L5.209
	Método de ensaio	SET/95

SUMÁRIO

Introdução

- 1 Objetivo
- 2 Normas complementares
- 3 Definições
- 4 Aparelhagem
- 5 Meios de cultura e soluções
- 6 Execução do ensaio
- 7 Resultados

- ANEXO A Pré-secagem do meio de cultura
ANEXO B Recomendações de ordem geral
ANEXO C Referências bibliográficas

INTRODUÇÃO

O manganês é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre. Encontra-se na natureza como vários óxidos e hidróxidos. O manganês não é realmente considerado um componente tóxico, mas sua presença em ambientes aquáticos pode constituir-se em um problema, em virtude da oxidação e deposição do metal causada por microrganismos, principalmente bactérias.

O primeiro trabalho sobre oxidação biológica do manganês foi desenvolvido por Bijerinck, que descreveu várias bactérias que apresentavam essa capacidade. O processo de oxidação foi demonstrado pela adição de uma amostra de solo a um meio com ágar contendo sais manganosos. A ação microbiológica foi evidenciada pelo desenvolvimento de colônias com coloração marrom resultante do acúmulo de óxido mangânico. As colônias também podem apresentar-se filamentosas ou achatadas, lembrando as colônias características do gênero *Leptothrix*.

Dentre as bactérias que depositam o ferromanganês, incluem-se as clássicas tais como: *Sphaerotillus*, *Gallionella*, *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Clonothrix* e as mais recentemente descritas *Metallogenium*, *Siderocapsaceae*, *Pedomicrobium* e *Hyphomicrobium*. Além dessas, várias bactérias heterotróficas são capazes de realizar esta oxidação: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Chromobacterium*, *Oceanospirillum*, *Caulobacter*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Streptomyces*. O crescimento e desenvolvimento desses microrganismos em larga escala nos sistemas de distribuição, se manifesta através da turvação, alteração da cor da água, e também está associado com a tuberculização e corrosões de tubulações. Nos sistemas de distribuição de água potável, podem provocar escurecimento e odor desagradável.

As bactérias que depositam óxidos de manganês estão distribuídas em uma ampla variedade de ambientes, incluindo solos, pântanos, nascentes, represas, lagos, mares rasos e profundos. Apesar das diferenças geoquímicas entre esses ambientes, parece que a deposição do ferro e manganês frequentemente ocorre em zonas onde o ferro e o manganês solúveis, o O₂ e as bactérias que depositam ferro e manganês coexistam pelo menos parte do tempo.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método que permite a contagem de colônias de bactérias que oxidam o manganês através da técnica de "spread-plate", como instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

- a) avaliação das condições de poços, fontes, reservatórios e sistemas de distribuição de água para consumo humano;
- b) avaliação de eficiência das diversas etapas de operação de estações de tratamento de água na remoção dessas bactérias;
- c) estimativa da biomassa de bactérias que oxidam manganês 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 Laboratórios de microbiologia - Norma Técnica CETESB
 - L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos - Norma Técnica CETESB
 - L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura - Norma Técnica CETESB
- Guia de Orientação de Coleta e Preservação de Amostras de Água - CETESB/SEMA.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.4.

3.1 Bactérias heterotróficas

Bactérias que requerem um ou mais compostos orgânicos como fonte de carbono.

3.2 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

3.3 p.a.

Para análise.

3.4 Densidade de bactérias

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

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1.05 kgf/cm³ ou 15 lb/pol²) produzindo uma temperatura de 121,6°C, ao nível do mar. Em seu funcionamento deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara: a operação total desse equipamento deve durar, no mínimo, uma hora; é recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.2 Balança

Com sensibilidade de 0.1 g ao pesar 150 g.¹

4.1.3 Banho-maria

Equipado com termostato para manutenção da temperatura na faixa de 44-46°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo o meio de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.²

4.1.4 Capela de fluxo laminar

Equipada com filtro que possibilite a remoção de partículas presentes no ar filtrado de maneira laminar, diretamente sobre a área de trabalho. Este equipamento é de uso opcional, podendo o teste ser realizado em ambiente que proporcione o grau de assepsia requerido.

4.1.5 Destilador de água ou aparelhos para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam a multiplicação bacteriana ou interfiram nela³, cuja condutividade deve ser inferior a 2µS/cm² a 25°C e pH na faixa de 5.5 a 7.5.

4.1.6 Estufa de esterilização

Mantida a uma temperatura de 170 ± 10°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas).

4.1.7 Incubadora bacteriológica termostatizada

Deve manter a temperatura na faixa de 25 ± 0,5°C e a umidade relativa entre 75 e 85%.⁴

-
- 1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; precisam ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.
 - 2 Devem ser feitos registros contínuos e periódicos da temperatura e os termômetros usados graduados com intervalo de escala de 1°C. As estantes a serem colocadas no banho-maria têm que ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.
 - 3 A densidade de bactérias heterotróficas na água recém destilada deve ser inferior a 1000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 1000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal (Norma CETESB L5.215).
 - 4 A verificação de temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de duas vezes ao dia) através de termômetros (com bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termómetro de máxima e de mínima na sua parte central. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação em seu interior de um dispositivo para circulação do ar.

4.1.8 Placa rotatória ("roter-plate")

Projetada para imprimir um movimento de rotação com velocidade angular de 50 rpm a placas de Petri contendo o meio de cultura sólido em seu interior.

4.1.9 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, devendo apresentar o campo quadriculado (quadrados de 1 cm²).

4.1.10 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH 4.0, pH 8.86 ou pH 9.18).

4.1.11 Refrigerador

Deve manter a temperatura na fixa de 2 a 10°C.

4.2 Vidraria

4.2.1 Frascos para coleta de amostras

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

4.2.2 Frascos para água de diluição

De borossilicato ("pirex") ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis.

4.2.3 Frascos para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro neutro ou aço inoxidável. Devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica.

4.2.4 Pipetas

De borossilicato, 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%.

4.2.5 Placas de Petri

De borossilicato ("pirex") ou vidro neutro de boa qualidade, ou de plástico atóxico transparente. O fundo deve ser perfeitamente plano, sem ranhuras nem bolhas de ar, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.6 Bastonetes de vidro (alças de Drigalski)

Com 4 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento, apresentando a 4 cm de uma das extremidades, uma inclinação de 45°.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.2 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.3 Estojo para pipetas

Utilizar para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou de aço inoxidável, de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para esterilização.

4.3.4 Papel alumínio.

4.3.5 Papel Kraft.

4.3.6 Tela de amianto.

4.3.7 Termômetros.

4.3.8 Tripé.

5 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Nota: Para o preparo de meios de cultura, devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório, a partir de seus componentes específicos, devendo ser utilizados para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a.).

5.1 Meio para bactérias que oxidam o manganês

5.1.1 Fórmula

Citrato de cálcio	10,0 g
Sulfato de amônio [(NH ₄)SO ₄ .H ₂ O]	1,0 g
Sulfato manganoso (MnSO ₄ .H ₂ O)	5,0 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,001 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 mL

5.1.2 Preparo

Pesar os componentes e acrescentar 1000 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. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri contendo o meio para bactérias que oxidam o manganês podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante o período máximo de 15 dias.

5.2 Água de diluição

5.2.1 Fórmula

Solução-estoque A	1,25 mL
Solução-estoque B	5,0 mL
Água destilada	1000 mL

5.2.2 Preparo

- a) preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.	34,0 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro de água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C . durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.⁵

- b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	81,1 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C . durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.⁵

- c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a um litro de água destilada:

- d) distribuir em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 90 ± 2 mL:

- e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos; e

- f) armazenar à temperatura ambiente.

5.3 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.3.1 Fórmula

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.	40,0 g
Água recém destilada	1000 mL

5.3.2 Preparo

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 1000 mL de água recém destilada. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

⁵ 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.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Princípio do método

A determinação da contagem de bactérias que oxidam o manganês em uma amostra baseia-se no princípio de que em meio enriquecido com sais de manganês, sob condições adequadas de temperatura e tempo de incubação, as bactérias viáveis serão evidenciadas através da formação de colônias típicas (marrons, filamentosas ou achatadas), devido a precipitação do manganês na forma de óxido manganíco.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta de Amostras de Água, da CETEB, 1988.

6.2.1 Amostra

6.2.2 Identificação

A amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (n^o da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

6.2.3 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.

6.2.4 Agentes quelantes

Para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 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 (pH final = 6,5), 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, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

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

6.3 Procedimento

6.3.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada do laboratório ou a capela de fluxo laminar, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

6.3.2 Preparar as placas de Petri contendo o meio para bactérias que oxidam o manganês, verificando se não há umidade na superfície do mesmo.

6.3.3 Proceder à marcação das placas em duplicata para cada volume da amostra a ser inoculado, 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.

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

6.3.5 Com uma pipeta esterilizada de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, pipetar 1,0 mL da amostra e inocular volumes de 0,5 mL na superfície do meio de cultura nas placas de Petri correspondentes a esse volume. O inóculo deve ser depositado no centro da placa. Observar que para aplicação dessa técnica, o meio de cultura deve ser submetido a uma desidratação prévia após sua distribuição em placas, visando facilitar a absorção do inóculo (Anexo A).

6.3.6 Colocar cada placa de Petri aberta, já com o inóculo na superfície do meio de cultura, na placa rotatória e ligar o equipamento.

6.3.7 Com um bastonete de vidro (alça de Drigalski) devidamente flambado e esfriado, tocar levemente a superfície do meio de cultura contendo o inóculo, de maneira que, com o movimento de rotação imprimido à placa de Petri pelo equipamento, se obtenha o espalhamento do inóculo na superfície do meio de cultura. Nesta operação, tomar cuidado para não ferir o ágar.

6.3.8 A seguir, retirar a placa de Petri do equipamento e fechá-la.

6.3.9 Para inoculação de volumes de 0,1 mL da amostra, proceder na seqüência descrita nos itens anteriores, usando para inoculação da amostra na superfície do meio de cultura, pipetas esterilizadas de 0,1 mL.

6.3.10 Após a semeadura, deixar as placas à temperatura ambiente durante o tempo suficiente para que o inóculo seja absorvido pelo meio nutriente.

6.3.11 Quando for necessário examinar volumes decimais inferiores a 0,1 mL da amostra, proceder da seguinte maneira:

6.3.11.1 Homogeneizar a amostra (como em 6.3.4) 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 ± 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.

6.3.11.2 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 ± 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.

6.3.11.3 Proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-8}).

6.3.12 Homogeneizar a diluição desejada (como em 6.3.4) e, obedecendo aos cuidados de assepsia e inocular volumes de 0.5 e 0.1 mL conforme descrito em 6.3.5 e 6.3.9.

6.3.13 Incubar as placas a 20°C durante 10 dias, em posição invertida, para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio.

6.3.14 Após o período de incubação, efetuar a leitura das placas com o auxílio de um contador de colônias e calcular a densidade de bactérias que oxidam o manganês conforme descrito no item 7.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da densidade de bactérias que oxidam o manganês

7.1.1 Selecionar para leitura as placas em duplicata correspondentes ao volume inoculado que tenha fornecido contagens e multiplicar o resultado pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

Exemplo: Para uma amostra cujo volume selecionado foi 0,001 mL (10^{-3}) e os valores obtidos foram 40 e 46 colônias, calcular conforme se segue:

$$\frac{\text{soma dos valores das duplicatas}}{2} \cdot \text{inverso da diluição} = \text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/mL} = \frac{40+46}{2} \cdot 10^3 = 43000$$

7.1.2 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens inferiores a 30, efetuar as contagens na duplicata correspondente ao maior volume. Calcular a média aritmética e multiplicar o valor pela diluição utilizada.

Exemplo: Para uma amostra cujo maior volume inoculado foi 1 mL (10^0) e os valores obtidos foram 6 e 8 colônias, calcular conforme se segue:

$$\frac{\text{soma dos valores das duplicatas}}{2} \cdot \text{inverso da diluição} = \text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/mL} = \frac{6+8}{2} \cdot 1 = 7$$

7.1.3 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, porém o menor volume inoculado fornecer contagens próximas a 300, efetuar as contagens nas placas correspondentes a esse volume. Calcular a média aritmética das contagens e multiplicar o resultado pelo inverso da diluição utilizada nas placas.

Exemplo: Para uma amostra cujo menor valor inoculado foi 0,01 mL (10^{-2}) e os valores obtidos foram 380 e 400 colônias, calcular conforme se segue:

$$\frac{\text{soma dos valores das duplicatas}}{2} \cdot \text{inverso da diluição} = \text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/mL} = \frac{380 + 400}{2} \times 10^2 = 39000$$

7.1.4 Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens muito superiores a 300, proceder conforme um dos seguintes casos:

7.1.4.1 Placas com menos de 10 colônias por cm^2 : efetuar as contagens em 13 cm^2 (13 quadrados do contador de colônias), que apresentem distribuição representativa de colônias, em cada uma das placas em duplicata correspondentes ao volume selecionado para contagem, utilizando se possível sete quadrados consecutivos horizontalmente e seis quadrados verticalmente. Multiplicar a soma das contagens de cada placa por cinco (quando a área da placa for de 65 cm^2). Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

Exemplo: Para uma amostra, cujo volume selecionado para leitura foi de 0,1 mL (10^{-1}) e as somas dos 13 quadrados obtidos no contador para cada placa (de vidro) foram 116 e 98, multiplicar o valor obtido para cada placa por cinco. Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição.

$$\text{soma dos valores dos 13 quadrados da placa} \times 5 = \text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/placa}$$

$$\frac{\text{soma dos valores das duplicatas}}{2} \cdot \text{inverso da diluição} = \text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/mL} = \frac{(116 \times 5) + (98 \times 5)}{2} \cdot 10 = 5350$$

7.1.4.2 Placas com 10 a 100 colônias por cm²: efetuar a contagem em quatro quadrados representativos (4 cm²) em cada uma das placas em duplicata selecionadas para leitura. Calcular a média aritmética das contagens por cm² para cada placa e multiplicar cada resultado pela área da placa em cm² (usualmente 65 para placas de vidro e 57 para placas de plástico). Calcular a média aritmética e multiplicar pelo inverso da diluição utilizada nessas placas.

Exemplo: Para uma amostra cujo volume selecionado foi 0,1 mL (10⁻¹) e os valores dos quadrados da duplicata foram 50, 40, 43, 37 e 36, 44, 42, 38 em placas de vidro, calcular conforme se segue:

soma dos valores dos quatro quadrados x área da placa = densidade de bactérias que oxidam o manganês/placa

$$\frac{50+43+46+37}{4} \times 65 = 2860$$

$$\frac{36+44+42+38}{4} \times 65 = 2600$$

$$\frac{\text{soma dos valores das duplicatas}}{2} \cdot \text{inverso da diluição} = \frac{\text{densidade de bactérias que oxidam o manganês/mL}}{2} \times 10 = 27300$$

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 Expressar o resultado em termos de unidade formadores de colônias de bactérias que oxidam o manganês por mililitro (UFC/mL).

7.2.1.1 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:

Valores de 101 a 1000

- Quando o algarismo das unidades for igual ou superior a cinco, somar uma unidade ao algarismo das dezenas. Exemplo: 145 é expresso como 150 UFC/mL.
- Quando o algarismo das unidades for inferior a cinco, considerá-lo como zero. Exemplo: 142 é expresso como 140 UFC/mL.

7.2.1.2 Quando os resultados finais obtidos forem superiores a 1000, considerar zero o algarismo das unidades e efetuar o arredondamento da seguinte forma:

- Quando o algarismo das dezenas for igual ou superior a cinco, somar uma unidade ao algarismo da centena. Exemplo: 1351 é expresso como 1400 UFC/mL.

- b) Quando o algarismo das dezenas for inferior a cinco, considerá-lo como zero. Exemplo: 1348 é expresso como 1300 UFC/mL.

7.2.2 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).

7.2.3 Se as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem mais que 100 colônias por cm², expressar o resultado como >6500 para placas de vidro ou como >5700 para placas de plástico, multiplicado pelo inverso do menor volume inoculado (exemplo: para uma amostra cujo menor volume inoculado foi 0,01 mL, o resultado é expresso como >650000 para placas de vidro ou >570000 UFC/mL para placas de plástico).

Nota: Neste caso, o resultado deve ser expresso como "contagem estimada".

7.2.4 Quando as placas não puderem ser contadas devido a erro nas diluições, quebra accidental das amostras ou quando se observarem evidências de contaminação, relatar o resultado como: "análise prejudicada devido a acidente de laboratório", e requisitar nova amostra para repetição da análise.

7.3 Relatório

Do relatório deve constar no mínimo:

- local e datas de coleta e análise;
- caracterização completa da amostra (tipo de água, cloro residual, temperatura, etc.);
- nome do coletor da amostra;
- resultado do ensaio, expresso conforme 7.1;
- código desta Norma e técnica utilizada;
- nome e assinatura do responsável pela análise.

/ANEXO A

ANEXO A - Pré-secagem do meio de cultura a ser utilizado na técnica de "spread plate"

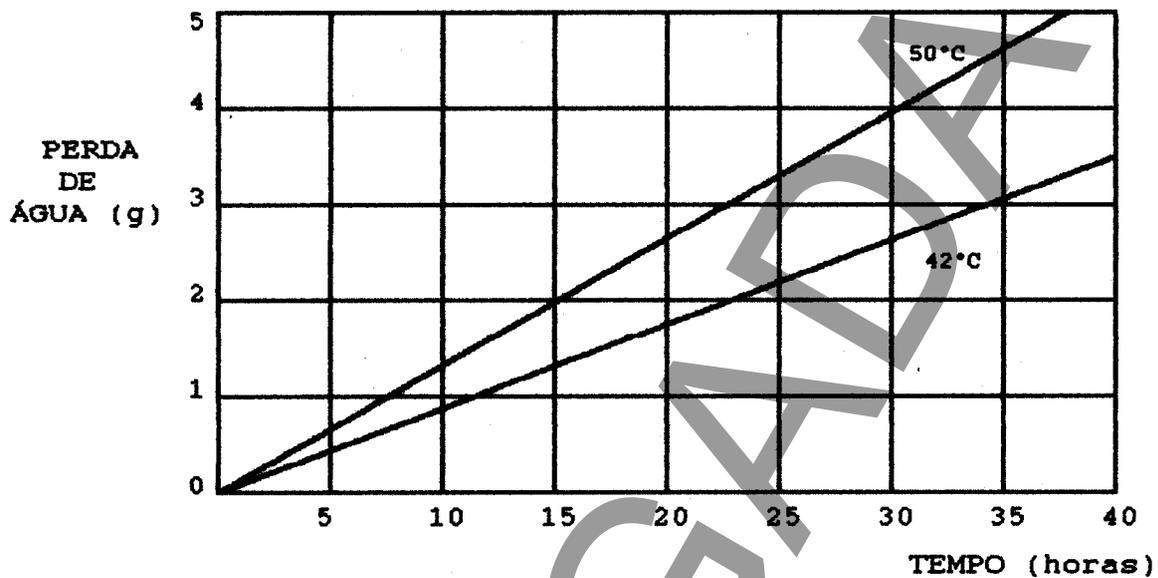
A-1 Após a distribuição do meio de cultura em placas de Petri, o mesmo deve ser submetido a uma pré-secagem para ser obtida uma perda de 2 a 3 g de água. Essa pré-secagem tem como finalidade facilitar a absorção do inóculo da amostra, quando da realização da análise.

A-2 A desidratação do meio de cultura pode ser obtida através de sua incubação a uma determinada temperatura e durante um determinado período. A Tabela e a Figura 1 sintetizam a relação entre a perda de água e temperaturas e tempos de incubação. Essa pré-secagem pode também ser feita através de exposição das placas abertas ao fluxo de ar em câmaras de fluxo laminar.

TABELA - Efeito da temperatura de secagem na perda de água de placas com 15 mL de meio de cultura, estocadas separadamente (1)

Temperatura (°C)	Tempo requerido para perda de água (em h)							
	com tampa				sem tampa			
	1g	2g	3g	4g	1g	2g	3g	4g
24	32h	64h	95h	125h	3.7h	7.0h	10.5h	14.0h
37	17h	35h	51h	67h	1.7h	3.5h	5.3h	7.0h
50	6h	12h	18h	24h	0.7h	1.3h	1.9h	2.7h
60	4h	8h	12h	16h	-	-	-	-

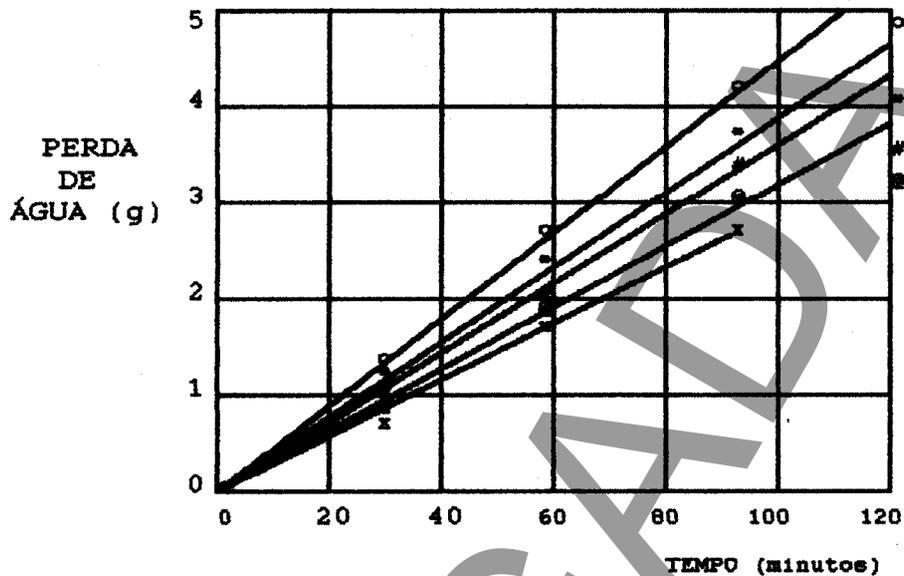
(1) Fonte: Dutka, B.J. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada Centre for Inland Waters, Burlington, Ontario, 1978.



FONTE: Water Purification Lab., Chicago Dep. Water (dados não publicados). In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985.

FIGURA 1 - Efeito da temperatura de secagem na perda de água de placas com 15 mL de meio de cultura, estocadas separadamente, sem tampa e em posição invertida

A-3 A Figura 2 sintetiza os resultados obtidos pelo Alberta Environmental Centre-Vegreville, Canada, em um estudo efetuado nesse sentido (dados não publicados), com as placas colocadas em diferentes posições dentro da câmara de fluxo laminar.



Legenda:

- o distribuição no fundo da câmara, placas sem tampa
- * distribuição no fundo da câmara, placas parcialmente tampadas
- # distribuição próxima à borda da câmara, placas sem tampa
- @ distribuição próxima à borda da câmara, placas parcialmente tampadas
- x distribuição ao acaso, placas sem tampa

Fonte: Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alta. (dados não publicados). In: *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985.

FIGURA 2 - Secagem do meio de cultura (25 mL) em placas em câmara de fluxo laminar (temperatura ambiente 24°C a 25°C, umidade relativa 30% a 33%, velocidade do ar 0,6 m/s) - Efeito da posição das placas

ANEXO B - Recomendações de ordem geral

B-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

B-2 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa contendo os 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.

B-3 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.

B-4 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 armazenamento 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.

B-5 Cuidados no preparo dos meios de cultura

B-5.1 Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quanto à cor, odor e, principalmente, consistência não devendo apresentar-se endurecidos ou hidratados. 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.

B-5.2 A hidratação dos meios deve ser realizada com água destilada fria, principalmente para os meios que contêm 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 de molho, em água destilada fria durante 15 minutos, os meios que contêm ágar, agitando-se a mistura freqüentemente e utilizando recipientes com volumes duas ou três vezes maiores do que seu conteúdo, para facilitar a homogeneização.

B-6 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle da qualidade dos meios de cultura a serem empregados no teste para determinação da densidade de bactérias heterotróficas (ver Norma CETESB L5.216).

B-7 Local de trabalho

O trabalho deve ser efetuado, de preferência, em câmara asséptica ou em câmaras de fluxo laminar.

B-7.1 Câmara asséptica

As câmaras assépticas devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e ser livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. Conversa desnecessária deve ser evitada.

B-7.1.1 Limpeza da câmara: é feita após o expediente diário, de preferência empregando solução de formalina ou outro desinfetante adequado. Chão, mesas e balcões devem ser limpos diariamente. Nos fins de semana, deve realizar-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente deve ser impregnado com vapor de formol puro, sendo o formol colocado em placas de Petri, para evaporar.

B-7.1.2 Lâmpadas germicidas (U.V.): podem ser ligadas nos intervalos de trabalho e assim permanecer durante a noite. Convém lembrar que estas lâmpadas têm tempo de vida relativamente curto (cerca de 6000 horas para lâmpadas de 30 watts), que sua eficiência depende da distância existente entre elas e a área a ser esterilizada, que apresentam ação superficial apenas, e que poeira acumulada em sua superfície diminui seu poder germicida.

B-7.1.3 Calor: o aquecimento excessivo da câmara asséptica deve ser evitado pelo ajuste da altura da chama do bico de Bunsen, através de seu dispositivo regulador ou pelo uso de uma pinça de Mohr na mangueira de alimentação de gás. Se a câmara tiver ar condicionado, que a entrada desse ar não se dê diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha filtro de ar especial.

B-7.2 Câmara de fluxo laminar

Proporciona grande segurança, pois as partículas existentes no ar são removidas pela passagem do mesmo através de um filtro absoluto. O ar filtrado é dirigido sob a forma de um fluxo direto sobre a área de trabalho, mantendo as condições de esterilidade. A limpeza da câmara deve ser feita sempre no final do trabalho.

ANEXO C - Referências bibliográficas

- C-1 ALEXANDER, M. - Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sidney, 1967.
- C-2 DUTKA, B.J. - Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada Centre for Inland waters, Burlington, Ontario, 1976.
- C-3 GUIORSE, W.C. & CHAPNICK, S.D. - Metal depositing bacteria and the distribution of manganese and iron in swamp waters. *Ecol. Bull.*, 35: 367-376, 1983.
- C-4 GUIORSE, W.C. - Biology of iron and manganese - depositing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38: 515-550, 1984.
- C-5 STALEY, J.A. - Iron and manganese - oxidising and/or depositing bacteria. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore. Williams & Wiekins, 1989, V.3, p. 1873-1882.
- C-6 SLY, L.I.; HODKINSON, M.C. & ARUNPAIROJANA, V. Deposition of manganese in a drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 628-639, 1990.
- C-7 TYLER, P.A. & MARSHALL, K.C. - Hyphomicrobia - A significant factor in manganese problem. *J. AWWA* 59: 1043-1048, 1967.
-