



NORMA TÉCNICA

L5.210

Nov/1989
30 PÁGINAS

Bactérias redutoras do sulfato (desulfovibrio) - determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos: método de ensaio

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

BACTÉRIAS REDUTORAS DO SULFATO (DESULFOVIBRIO) – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS
Método de ensaio

L5.210

NOV/89

SUMÁRIO

Pág.

Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	3
5 Execução do ensaio.....	9
6 Resultados.....	14
Anexo A - Meios de cultura alternativos para determinação da densidade de bactérias redutoras do sulfato.....	21
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	24
Anexo C - Esquema do procedimento.....	27
Anexo D - Referências bibliográficas.....	29

1 INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras do sulfato constituem um grupo de microrganismos fisiologicamente similares mas morfologicamente distintos. São bactérias Gram-negativas, estritamente anaeróbias, requerendo uma fonte orgânica de carbono (heterótrofos) e podem efetuar a redução do sulfato a sulfeto mediante a capacidade de oxidar diretamente o hidrogênio, obtendo a energia necessária para o crescimento.

O fenômeno biológico da redução dos sulfatos foi demonstrado experimentalmente pela primeira vez por Murray e Irvine em 1895. Pouco tempo depois, Beijerinck descreveu, sob o nome de Desulfovibrio desulfuricans, uma bactéria anaeróbia, móvel em forma de vírgula, que era capaz de liberar sulfeto de hidrogênio a partir de sulfatos, graças a certas substâncias redutíveis do meio. Depois dessa data, as bactérias redutoras do sulfato foram objeto de numerosas pesquisas, que permitiram precisar seu habitat, definir seus caracteres morfológicos, fisiológicos e estabelecer sua identificação e classificação. Estes microrganismos caracterizam-se por participar do processo de respiração denominada "redução desassimilatória de sulfatos" em que o íon sulfato atua como receptor terminal de elétrons em lugar do oxigênio. Outra característica desse grupo é que seu crescimento requer condições redutoras bastante severas (valores de potencial redox da ordem de -100 mV). São habitualmente encontradas no solo, águas de po

ços e ocorrem caracteristicamente em lama marinha e de água doce, onde as condições altamente anaeróbias associadas à presença de sulfatos, proporcionam o ambiente adequado para seu desenvolvimento. Sua capacidade de crescer em meios com alta concentração salina faz com que sejam frequentemente encontradas em água do mar e poços de água salobre. Podem também estar presentes em águas tratadas destinadas ao abastecimento público e industrial, em alimentos enlatados e trato intestinal dos homens e animais.

Dentro do grupo das bactérias redutoras do sulfato, é necessário distinguir dois gêneros: o Desulfovibrio, que são bactérias não esporuladas e o Desulfotomaculum que são esporuladas. A temperatura de 30°C favorece o desenvolvimento do gênero Desulfovibrio, podendo algumas espécies de Desulfotomaculum se desenvolverem também nesta temperatura. As bactérias anaeróbias redutoras do sulfato, principalmente as pertencentes ao gênero Desulfovibrio, estão associadas com problemas de corrosão, decorrentes de seus produtos metabólicos: sulfeto de hidrogênio (H₂S) e sulfeto (S), provenientes da redução de compostos de enxofre pela ação destas bactérias. Esses compostos além de serem agressivos, estão diretamente envolvidos na despolarização do metal, contribuindo significativamente nos processos de corrosão de encanamentos de circuitos de refrigeração, tuberculização de canalizações de água, esgoto, bem como na biodeterioração da qualidade de água.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para determinação da densidade de bactérias redutoras do sulfato, do gênero Desulfovibrio, pela técnica de tubos múltiplos, utilizado como instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

- a) avaliar as condições de proteção de poços, fontes, reservatórios e sistemas de distribuição de água para consumo humano;
- b) avaliar a eficiência das diversas etapas de operação de estações de tratamento de água na remoção destas bactérias;
- c) estimar a biomassa de bactérias redutoras do sulfato presentes em corpos d'água, solo, lama marinha e sedimento;
- d) prevenir e determinar as 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 3.4.

3.1 Gênero Desulfovibrio

As bactérias redutoras do sulfato pertencentes ao gênero Desulfovibrio são Gram-negativas e ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. Apresentam-se na forma de bastonetes curvos, sigmóide ou espiralado com 0,5-1,5 μm de diâmetro por 2,5-10,0 μm de comprimento. São anaeróbios obrigatórios, móveis por meio de um flagelo polar e não formam esporos. Microrganismos quimiorganotróficos, obtêm energia por respiração anaeróbia, reduzindo sulfatos e outros compostos redutíveis de enxofre a H_2S , apresentando raramente metabolismo fermentativo. Algumas espécies são moderadamente halofílicas. Oxidam lactato, piruvato e usualmente malonato a acetato e CO_2 . Os carboidratos são raramente utilizados. A temperatura ótima para seu crescimento está entre 25 a 35°C, sendo 44°C a temperatura limite e o pH entre 5,5 e 9,0 com um ótimo de 7,2.

3.2 Número mais provável (N.M.P.)

Estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos mediante a aplicação da técnica dos tubos múltiplos.

3.3 p.a.

Para análise.

3.4 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 da 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 Bico de Bunsen

Com funcionamento adequado para permitir uma combustão completa.

4.1.4 Destilador de água ou aparelho para desionização

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

4.1.5 Estantes de arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio

4.1.6 Estufa para esterilização e secagem

Deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda a 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 .

4.1.7 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.

4.1.8 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.

4.1.9 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 devem ser feitas periodicamente.

4.1.10 Sistema de anaerobiose

4.1.10.1 Jarras de anaerobiose autoclaváveis

Devem ser transparentes, feitas de termoplástico rígido e resistente, podendo ser autoclavadas. Suas tampas devem ser munidas de uma junta de borracha e um sistema de prensão que garantam vedação segura e ter, em sua face inferior, um cesto metálico contendo pastilhas de paládio e alumínio que irão atuar como catalisadores de reação entre o hidrogênio (H_2) e o oxigênio (O_2).

4.1.10.2 Indicador de anaerobiose

É constituído por um envelope contendo uma tira de papel de filtro embebido em uma solução de azul de metileno. Deve ser conservado entre 4°C e 10°C.

4.1.10.3 Sistema gerador de dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2)

É utilizado para obtenção de uma atmosfera anaeróbia dentro das jarras. Contém dois comprimidos: um de borohidreto de sódio, gerador de hidrogênio, outro de bicarbonato e ácido cítrico, gerador de dióxido de carbono.

4.1.11 Tela de amianto de 22 cm x 22 cm

4.1.12 Tripé

4.2 Materiais

4.2.1 Balão de fundo chato com capacidade para 1 L e 2 L

4.2.2 Balão volumétrico com capacidade para 100 mL e 1 L

4.2.3 Béquer com capacidade para 1 L

4.2.4 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.

4.2.5 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 ± 2 mL de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.6 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).

4.2.7 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 5 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.

4.2.8 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o volume necessário de meio de cultura e o inóculo da amostra. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e 16 mm x 150 mm.

4.3 Reagentes

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

- cloreto de amônio (NH_4Cl) p.a.;
- cloreto de cádmio (CdCl_2) p.a.;
- cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.;

- fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.;
- fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a.;
- hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- lactato de sódio p.a.;
- sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] p.a.;
- sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.;
- sulfato de sódio (Na_2SO_4) 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 Caldo de Starkey de concentração simples

Fórmula:

Lactato de sódio p.a.....	3,5 g
Cloreto de amônio (NH_4Cl) p.a.....	1,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.....	0,5 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.....	2,0 g
Sulfato de sódio (Na_2SO_4) p.a.....	0,5 g
Cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) p.a.....	0,1 g
Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] p.a.....	0,001 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 7,2.	

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1 N). Em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final após esterilização seja de 10 mL. Tamponar os tubos e esterilizar por autoclavação a 121°C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente durante o período máximo de 3 semanas, fora do alcance da luz.

4.4.2 Caldo de Starkey de concentração dupla

Fórmula:

Lactato de sódio p.a.....	7,0 g
---------------------------	-------

Cloreto de amônio (NH_4Cl) p.a.....	2,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.....	1,0 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	4,0 g
Sulfato de sódio (Na_2SO_4) p.a.....	1,0 g
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	0,2 g
Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] p.a.....	0,002 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final após a esterilização: 7,2.

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Em tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final após esterilização seja de 10 mL. Tamponar os tubos e esterilizar por autoclavação a 121°C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente durante o período máximo de 3 semanas, fora do alcance da luz.

4.5 Soluções

4.5.1 Solução de cloreto de cádmio a 10%

Fórmula:

Cloreto de cádmio (CdCl_2).....	10,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 10 g de cloreto de cádmio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizar bem até completa dissolução do cloreto de cádmio.

4.5.2 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

4.5.2.1 Fórmula da solução estoque A

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a.....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

4.5.2.2 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°C durante 14 minutos. Armazenar a 4°C .

4.5.2.3 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

4.5.2.4 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 dissolução, 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 .

4.5.2.5 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 ± 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.

4.5.3 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 NFórmula:

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.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

5.1.1 A determinação do número mais provável (NMP) de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio) em uma dada amostra é efetuada a partir da aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos cuja sementeira fornece resultados negativos em pelo menos um tubo da última série em que os mesmos foram inoculados e a combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade original das bactérias pesquisadas (NMP), através da aplicação de cálculo de probabilidade. Para análises de água, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, usando-se séries de 5 tubos para cada volume a ser inoculado. A determinação do NMP de bactérias redutoras do sulfato consiste na sementeira de volumes determinados da amostra em série de tubos contendo o caldo de Starkey com posterior incubação em condições de anaerobiose à temperatura de 25-28°C durante 14-21 dias. A produção de um precipitado preto constitui resultado positivo para presença de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio). Resultados duvidosos são submetidos à confirmação pela adição de uma solução de cloreto de cádmio. A presença de sulfeto férrico é indicada pela produção de um precipitado amarelo, indicando reação positiva para este microrganismo.

5.2 Reações

5.2.1 Caldo de Starkey

Neste meio de cultura as bactérias reduzem o sulfato contido no meio a sulfeto de hidrogênio que, reagindo com os íons de ferro, forma o sulfeto férrico, o qual confere ao meio um precipitado negro.

5.2.2 Caldo de Starkey com a adição da solução de cloreto de cádmio

Se houver a presença de sulfeto no meio, este reagirá com o cádmio formando o sulfeto de cádmio, observado por um precipitado amarelo.

5.2.3 Sistema gerador de Hidrogênio e Dióxido de Carbono

Por adição de água no envelope, há o desprendimento de hidrogênio (H₂) pelo borohidreto de sódio, e o desprendimento de dióxido de carbono (CO₂) pela reação entre o bicarbonato de sódio e o ácido cítrico.

Na presença do catalisador (paládio e alumínio), o hidrogênio reage com o oxigênio do ar presente na jarra formando água; desta forma, obtém-se uma atmosfera anaeróbia. O dióxido de carbono liberado favorece a multiplicação de certos organismos que seriam inibidos ou se desenvolveriam mal na ausência deste gás.

5.2.4 Indicador de anaerobiose

Para o controle das condições de anaerobiose, utiliza-se o indicador de azul de metileno que, na ausência de oxigênio, assume a forma reduzida incolor e, na presença de oxigênio, a forma oxidada, azul.

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 Os frascos para coleta, previamente esterilizados, devem ser cheios até a boca e suas tampas devem proporcionar boa vedação, evitando aeração.

5.3.1.3 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 a partir de amostras líquidas

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

5.4.2 Preparar os tubos com caldo de Starkey, exigidos para a prova, aquecê-los em água fervente durante aproximadamente 10 minutos para exclusão do ar existente no meio e esfriá-los rapidamente em água de torneira, antes do uso. Para as inoculações das porções de 10 mL da amostra, usar o caldo de Starkey de concentração dupla.

5.4.3 Proceder à marcação dos tubos, anotando em cada tubo o número da amostra designado pelo laboratório na ficha de registro de exames, o volume selecionado da amostra a ser inoculado e a data. Identificar também os frascos de água de diluição.

5.4.4 Com auxílio de uma pipeta estéril de 10 mL, homogeneizar a amostra lentamente, evitando a oxigenação da amostra. Proceder dessa maneira nas seqüências das inoculações para evitar aeração.

5.4.5 Com a mesma pipeta e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, antecipadamente identificada. Mergulhar a ponta da pipeta na água de diluição e escoar lentamente evitando a aeração da amostra. Prepara-se, assim, a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo, que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra.

5.4.6 Em seguida, com a mesma pipeta, semear 10 mL da amostra em cada um dos 5 tubos com caldo de Starkey de concentração dupla (evitando aeração), quando este volume for requerido para o ensaio.

5.4.7 Desprezar a pipeta de 10 mL e, com uma pipeta de 5 mL, inocular 1 mL da amostra em cada um dos tubos com caldo de Starkey de concentração simples, correspondentes a essa quantidade de inóculo.

5.4.8 Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição (10^{-1}) como em 5.4.4 e transferir 10 mL para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, conseguindo-se assim, a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL desta diluição corresponde a 0,01 mL da amostra, sempre observando que o inóculo deve ser depositado diretamente na água de diluição, evitando assim aeração e, conseqüentemente, oxigenação.

5.4.9 Proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 10^{-8} ).

5.4.10 Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo seqüência decrescente das mesmas (da maior para a menor diluição efetuada).

5.4.11 Proceder a homogeneização como em 5.4.4 usando uma pipeta estéril de 5 mL no frasco com a última diluição efetuada e semear 1 mL da diluição em cada um dos tubos de caldo de Starkey (em concentração simples), correspondentes a essa diluição.

5.4.12 Proceder dessa maneira, semeando de trás para frente, sempre com a mesma pipeta, da maior para a menor diluição.

5.4.13 Após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das di

luções requeridas para o exame, colocar os tubos inoculados dentro da jarra de anaerobiose e, em seguida, o sistema gerador de hidrogênio e dióxido de carbono e, o indicador de anaerobiose, procedendo da seguinte maneira:

5.4.13.1 Cortar a extremidade demarcada de cada envelope gerador de hidrogênio e dióxido de carbono e colocar, em posição vertical, 3 envelopes em cada jarra.

5.4.13.2 Afastar as bordas do envelope e, com uma pipeta, introduzir 10 mL de água pela abertura de cada um deles.

5.4.13.3 Abrir a metade do envelope do sistema indicador e colocá-lo de maneira que fique bem visível na jarra. O indicador é usado para controle das condições de anaerobiose e, caso permaneça azul, indica falhas de vedação da jarra ou de não funcionamento do catalisador.

5.4.13.4 Após colocação dos sistemas geradores e indicadores de anaerobiose, tampar imediatamente a jarra, tendo o cuidado de rosquear bem o parafuso da tampa.

5.4.13.5 Esperar durante alguns minutos e verificar se ocorreu a reação entre hidrogênio liberado pelo sistema gerador e o oxigênio presente na jarra. Isto é observado através da condensação nas paredes da jarra do vapor de água formado e do aquecimento devido à liberação de calor durante a reação.

5.4.14 Incubar a jarra contendo os tubos inoculados à temperatura de 25 a 28°C, durante 14 a 21 dias.

5.4.15 Após período determinado de incubação, efetuar a leitura considerando resultado positivo para os tubos que apresentarem precipitado negro. Os tubos em que se observar turvação e/ou precipitado dentro do meio de cultura são considerados como resultados duvidosos, devendo ser submetidos a confirmação pela adição de 3 a 4 gotas de uma solução cloreto de cádmio a 10%. Efetuar a leitura considerando resultado confirmativo positivo para os tubos que apresentarem precipitado amarelo. Adicionar cloreto de cádmio a um tubo negativo para controle. Anotar os resultados.

5.5 Para realização de amostras sólidas ou semi-sólidas

5.5.1 Proceder como 5.4.1 a 5.4.3.

5.5.2 Homogeneizar a amostra e transferir uma quantidade significativa para um béquer com capacidade de 1.000 mL.

5.5.3 Macerar a amostra previamente selecionada e se necessário re tirar, com auxílio de uma pinça, pedaços de madeira, papel, raízes, etc. Após esse processo homogeneizar novamente a amostra.

5.5.4 Pesar 50 g da amostra já macerada e homogeneizada e transferir para um balão contendo 450 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim, a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 g da amostra.

5.5.5 Com o auxílio de uma pipeta estéril de 10 mL, homogeneizar lentamente a amostra contida no balão, evitando desta maneira uma excessiva aeração da mesma.

5.5.6 Após a homogeneização, proceder conforme 5.4.8 a 5.4.15.

Nota: Para amostras de resíduos sólidos (amostras sólidas ou semi-sólidas) calcular a quantidade de água presente na amostra e expressar o resultado em gramas de peso seco.

6 RESULTADOS

6.1 A densidade de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio) é expressa como NMP de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio) por 100 mL para amostras líquidas ou NMP por grama de peso seco para amostras sólidas ou semi-sólidas.

6.2 O NMP de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio) é obtido através de tabelas em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

6.3 A Tabela 1 fornece o NMP para todos os resultados possíveis, quando são inoculadas 5 porções de 10 mL da amostra.

6.4 A Tabela 2 fornece o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são inoculadas 5 porções de 10 mL, 5 porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL da amostra. Embora os volumes indicados nesta Tabela se refiram mais especificamente a amostras de água pouco poluídas, ela pode ser também utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por 3 algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em 3 séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de bactérias redutoras do sulfato (Desulfovibrio) o código é composto a partir do número de tubos do meio caldo de Starkey em relação aos quais a positividade dos resultados duvidosos foi confirmada com a adição da solução de cloreto

de cádmio (formação de sulfeto de cádmio e produção de um precipitado amarelo difusível neste meio). Na utilização da Tabela 2 deve observar-se o disposto em 6.4.1 a 6.4.1.3.

TABELA 1 - NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são utilizadas 5 porções de 10 mL

Número de tubos que apresentam reação positiva, a partir de 5 tubos de 10 mL	NMP por 100 mL	Limites de confiança de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	infinito

6.4.1 Quando são inoculados apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados os volumes indicados na Tabela (10 mL, 1 mL e 0,1 mL), o NMP é obtido diretamente a partir da Tabela. Para isto, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente. O quadro a seguir mostra alguns exemplos, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

Exemplos	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com			Código (combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100 mL
	10 mL	1 mL	0,1 mL		
1	5	2	0	520	50
2	4	2	0	420	22
3	5	5	1	551	300
4	5	5	5	555	≥1600

6.4.2 Quando são inoculados apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados outros volumes decimais que os indicados no quadro a seguir,

procura-se o código formado pelo número de tubos com resultado positivo obtido nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor de NMP correspondente a ele; o NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

O quadro a seguir mostra alguns exemplos:

Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	100 mL	10 mL	1(10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL				
100 a 10 ⁻⁰	5	4	0					540	130	$130 \times \frac{10}{100}$	13
10 ⁰ a 10 ⁻²			5	0	0			500	23	$23 \times \frac{10}{1}$	230
10 ⁻¹ a 10 ⁻³				4	1	0		410	17	$17 \times \frac{10}{0,1}$	1700
10 ⁻² a 10 ⁻⁴					3	0	0	300	8	$8 \times \frac{10}{0,01}$	8000

6.4.3 Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados, para a composição do código são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a 3 séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentarem resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontrando-se o código na Tabela e o NMP a ele correspondente, o valor final do NMP será obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Valor de NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado, selecionado para compor o código.}}$$

O quadro a seguir mostra alguns exemplos de casos que podem ocorrer:

Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	10 mL	10 ⁰ mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL				
10 a 10 ⁻²	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>				531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1,1x10 ³
10 ⁰ a 10 ⁻⁴		5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0		521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7,0x10 ³
10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵			5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	0	520	50	$50 \times \frac{10}{0,001}$	5,0x10 ⁵
10 ⁻² a 10 ⁻⁶				5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3x10 ⁵

Nota: Números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

6.4.4 Quando os resultados não se enquadram em nenhum dos 3 casos anteriores, eles são considerados "casos especiais" e devem ser tratados como segue:

- se menos que três das diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, para a composição do código são selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver exemplo 1 do quadro a seguir);
- se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao nº de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver exemplo 2 do quadro a seguir);
- embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores àqueles selecionados para a formação do código, se isto ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra como resultado positivo nos cinco tubos, seguido do número de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver exemplo 3 do quadro a seguir);
- se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar para

Tabela 2 - NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados dos positivos e negativos, quando são utilizadas 5 porções de 10 mL, 5 porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL

Nº de tubos que apresentam reação positiva quando são utilizados:			NMP/100 mL	Limites de confiança de 95%	
5 tubos de 10 mL	5 tubos de 1 mL	5 tubos de 0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	29
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	>1600	-	-

a composição do código as três maiores diluições (ver exemplo 4 do quadro a seguir);

- e) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados negativos, selecionar para a formação do código as três menores diluições (ver exemplo 5 do quadro a seguir);

O quadro a seguir mostra alguns exemplos de casos que podem ocorrer.

Exemplos	Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
		10 mL	(10 ⁰) mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL	10 ⁻⁵ mL				
1	10 ⁰ a 10 ⁻³		4	1	0	0			410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	
2	10 ⁰ a 10 ⁻⁵		5	5	4	1	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	2,2x10 ⁴
3	10 ⁰ a 10 ⁻⁴	4	5	4	0	0	0		540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	1,3x10 ³
4	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵			5	5	5	5	5	555	>1600	$>1600 \times \frac{10}{0,001}$	>1,6x10
5	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵			0	0	0	0	0	000	<2	$<2 \times \frac{10}{0,1}$	<200

REVOGADA

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DO SULFATO (DESULFOVIBRIO)

Alguns autores utilizam meios alternativos ao caldo de Starkey para a determinação do N.M.P. de Bactérias Redutoras do Sulfato (Desulfovibrio) em amostras de águas, esgotos e resíduos sólidos.

São apresentados a seguir as especificações relativas à composição e preparo desses meios de cultura.

A-1 MEIO SULFATO API (recomendado pelo "American Petroleum Institute")

MEIO SULFATO API (concentração simples)

Fórmula:

Extrato de levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Lactato de sódio	5,2 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....	0,2 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	0,01g
Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$]	0,1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0 g
Água destilada	1000,0mL

Preparo:

Pesar 16,6 g do meio desidratado "Sulfate API Broth" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Aquecer levemente, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave, a 121°C, durante 15 minutos.

MEIO SULFATO API (concentração dupla)

Fórmula:

Extrato de levedura	2,0 g
Ácido ascórbico	0,2 g
Lactato de sódio	10,4 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,4 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	0,02g
Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$].....	0,2 g
Cloreto de sódio (NaCl)	20,0 g
Água destilada	1000,0mL

Preparo:

Pesar 33,2 g do meio desidratado "Sulfate API Broth" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer levemente, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaios de 18 mm x 180 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

A-2 MEIO SULFATO-REDUTOR (recomendado pelo "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 16 ed)

Fórmula:

Peptona.....	2,0 g
Lactato de sódio.....	3,5 g
Extrato de carne.....	1,0 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....	2,0 g
Sulfato de sódio (Na_2SO_4).....	1,5 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4).....	0,5 g
Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$].....	0,392 g
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$).....	0,10 g
Ascorbato de sódio.....	0,10 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: $7,5 \pm 0,3$	

Preparo:

Pesar os reagentes, excluindo o sulfato ferroso amoniacal e o ascorbato de sódio. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Homogeneizar e aquecer, agitando frequentemente, até completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Com todos os cuidados de assepsia distribuir o meio em tubos com tampa de rosca e esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

No dia do uso, preparar as soluções de sulfato ferroso amoniacal e ascorbato de sódio e no momento da inoculação da amostra, adicionar assepticamente para cada 10 mL do meio de cultura básico, 0,1 mL da solução de sulfato ferroso amoniacal e 0,1 mL da solução de ascorbato de sódio. Após a inoculação das soluções e da amostra, encher completamente o tubo em teste com o meio sulfato redutor extra.

SOLUÇÃO DE SULFATO FERROSO AMONIACALFórmula:

Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$].....	3,92 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Para o preparo desta solução, pesar 3,92 g do sulfato ferroso amoniacal e dissolver em 100 mL de água destilada fria. Homogeneizar e esterilizar em membrana filtrante de 0,45 μm . Estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, sob refrigeração.

SOLUÇÃO DE ASCORBATO DE SÓDIOFórmula:

Ascorbato de sódio	1,0 g
Água destilada	100,0mL

Preparo:

Para o preparo desta solução, pesar 1,0 g do ascorbato de sódio e dissolver em 100 mL de água destilada fria. Homogeneizar e esterilizar em membrana filtrante de 0,45 μm . Estocar em frasco com tampa de borracha ou tampa de rosca, sob refrigeração.

/ANEXO B

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALB-1 Seleção de diluições

Para amostras de água não potáveis, um mínimo de 3 séries de 5 tubos devem ser inoculadas com volumes adequados da amostra ou de suas diluições. A seleção desses volumes decimais da amostra é feita pelo analista com base em sua experiência sobre a provável densidade de Bactérias Redutoras do Sulfato (Desulfovibrio) presente, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada e/ou sobre dados prévios sobre a amostra. É fundamental que sejam selecionadas com cuidado as porções decimais a serem inoculadas, para que resultados numéricos significativos sejam obtidos; assim sendo, nos casos em que não se tem um conhecimento prévio sobre a amostra é recomendável a inoculação de um maior número de volumes decimais da mesma.

B-2 Cuidados especiais com a vidraria

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

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 na 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 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle dos meios de cultura a serem empregados no ensaio para de terminação do NMP de Bactérias Redutoras do Sulfato (Desulfovibrio). Ver Norma CETESB L5.216.

B-5 Método alternativo para estabelecimento de atmosfera anaeróbia em jarras

Remover o ar contido na jarra estabelecendo vácuo e introduzir uma mistura de gases (80 - 90% de nitrogênio, 5 - 10% de hidrogênio e 5 - 10% de dióxido de carbono). O hidrogênio é utilizado para, frente ao catalizador, combinar-se com possíveis resíduos de oxigênio. Deve-se usar um indicador para controle das condições de anaerobiose.

B-6 Recuperação do catalizador (paládio e alumínio)

O excesso de umidade ou a ação do sulfeto de hidrogênio podem causar a inativação do catalizador. Sua recuperação pode ser feita através de aquecimento em estufa a 160°C durante duas horas. Após a recuperação, deve ser mantido em dessecadores.

B-7 Precauções

B-7-1 Todas as operações mencionadas com as jarras devem ser efetuadas longe de qualquer chama, pois o hidrogênio liberado é susceptível de se inflamar.

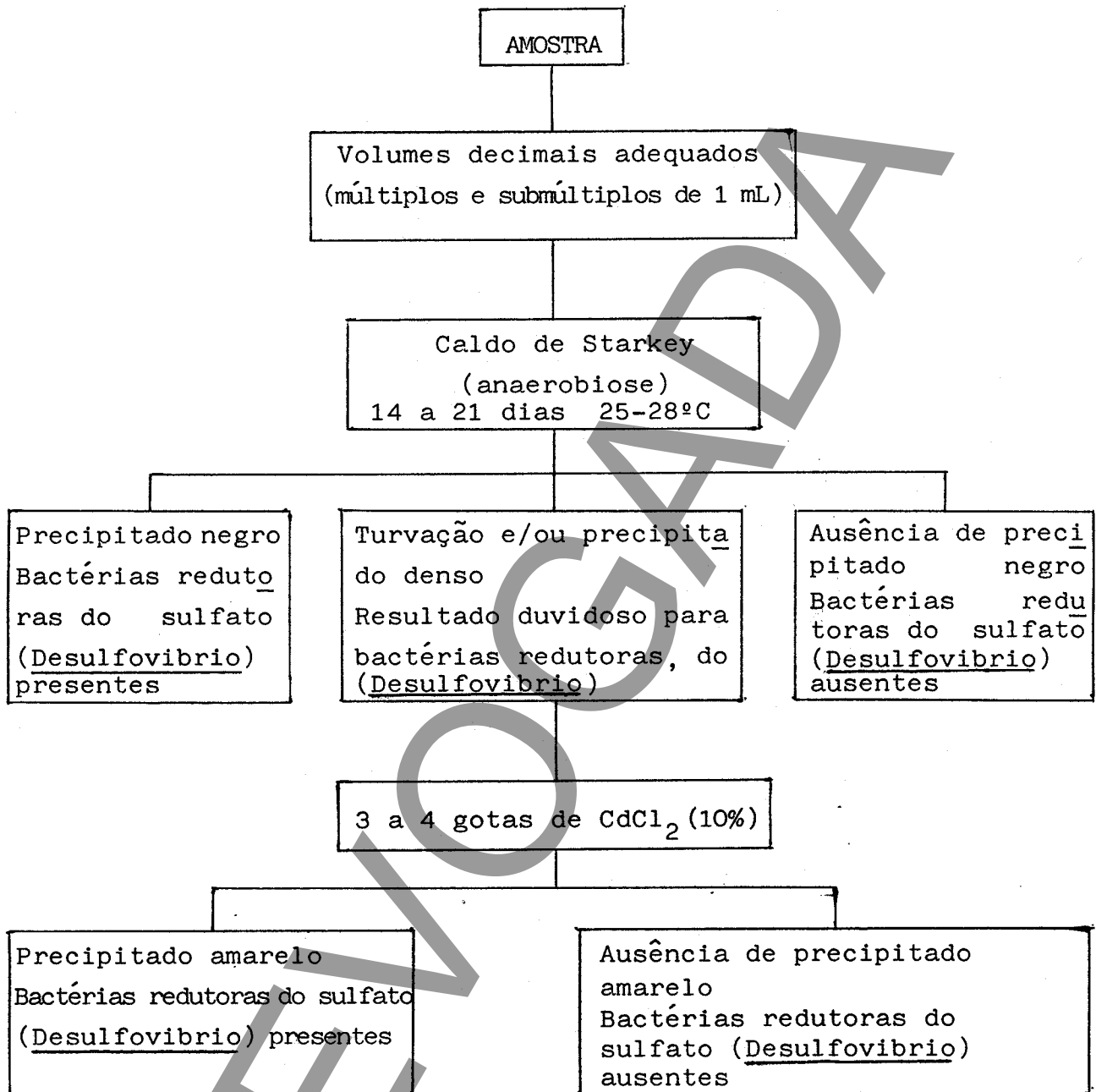
B-7-2 Para a limpeza das jarras, evitar o uso de qualquer abrasivo, solvente ou detergente. Basta lavá-las com água e secar cuidadosamente.

/Anexo C

RENOVADA

REVOGADA

ANEXO C - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO



REVOGADA

ANEXO D - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D-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.
- D-2 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986, 1ª rev. (N.T.M1.001).
- D-3 ——— - Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (N.T.L5.216).
- D-4 ——— - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985, 1ª rev. (N.T.L5.215).
- D-5 ——— - Avaliação de laboratório de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978, (N.T.L5.010).
- D-6 ——— - Guia de orientação para coleta e preservação de amostras. São Paulo, 1982. 201p.
- D-7 DUTKA B.J. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada, Centre for Inland Waters, Burlington, Ontario, 1976.
- D-8 LECLERC, H.; OGER, C. & BEERENS, M. Occurrence of sulphate reducing bacteria in the human intestinal flora and in the aquatic environment. Water Research, 14, 253-256, 1980.
- D-9 MARA, D.D. & WILLIAMS, D.J.A. The evaluation of media used to enumerate sulphate - reducing bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 33:543-552, 1970.
- D-10 MAREZ, A.; TELLIER, E. & LECLER, H. Vibrions sulfato-réducteurs et corrosions biologiques. Annales de L'Institut Pasteur de Lille, 24:137-176, 1971.
- D-11 MILLER, J.D.A. Metals. In: Rose, A.H., Ed. Microbial Biodeterioration. London, Academic Press, 1981. cap.6 p. 149-202 (Economic Microbiology V.6).

- D-12 POCHON J. & TARDIEUX P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. S^t Mandé, Seine, 1962 (collection "Techniques de base").
- D-13 POSTGATE, J.R. The economic activities of sulphate-reducing bacteria. Progress in Industrial Microbiology, 2, 48-69, 1960.
- D-14 ——— - The sulphate-reducing bacteria. 2 ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
- D-15 ——— - Dissimilatory sulphate-or sulfur-reducing bacteria Genus Desulfovibrio. Kluver and van Niel 1936, 397^{AL}. In: KRIEG, N.R. et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore Williams & Wilkins, 1984, V. 1, sec. 7, p.666-672.
- D-16 STARKEY, R.L. Formation of sulfide by some sulfur bacteria. Journal Bacteriology, 33:545, 1937.
- D-17 VIDELA, H.A. Corrosão microbiológica, São Paulo, Edgard Blücher, 1981.