



# NORMA TÉCNICA

L5.217

Dez/1991  
34 PÁGINAS

Thiobacillus - Determinação do número mais provável de Thiobacillus s.p. em água pela técnica dos 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	<p align="center"><b>THIOBACILLUS – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS</b></p> <p align="center">Método de ensaio</p>	<p align="center">L5.217</p> <p align="center">DEZ/91</p>
--------	---	---

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas e documento complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	7
6 Resultados.....	20
Anexo A - Meios de cultura alternativos para determinação do número mais provável (NMP) de <u>Thiobacillus thioparus</u> e <u>Thiobacillus thiooxidans</u> .....	29
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	31
Anexo C - Referências bibliográficas.....	33

### INTRODUÇÃO

O gênero Thiobacillus é formado por um grupo de bactérias que metabolizam o enxofre e seus compostos. Algumas espécies são quimiolitotróficas obrigatórias e derivam sua energia da oxidação de compostos do enxofre reduzidos, incluindo sulfetos, enxofre elementar, tiosulfatos, politionatos e sulfitos. Em seu metabolismo, muitas espécies deste grupo dão origem a enxofre elementar e produzem como resultado parcial ou final o ácido sulfúrico, uma substância de natureza agressiva. Assim, variedades halofílicas de Thiobacillus thioparus, capazes de precipitar enxofre elementar a partir de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) têm sido encontradas em grande número nos locais onde ativa deposição de enxofre está se processando. Em águas marinhas contendo 1,2 gramas por litro de sulfeto de hidrogênio, T.thioparus forma mais de 0,5 gramas por dia de enxofre elementar, com cerca de 1/3 de sulfeto de hidrogênio oxidado totalmente a sulfato.

Os Thiobacillus se distribuem amplamente no solo, especialmente onde o enxofre oxidável é abundante (minas e depósitos de enxofre, minerais sulfídricos, áreas de tratamento de esgoto e fontes de gases de enxofre), bem como em águas doces, águas de drenagem das minas de carvão e em ambientes marinhos. Estas bactérias estão adaptadas ao ambiente ácido e seu estudo é de grande importância, tanto na lixiviação biológica de metais contidos em minerais sulfetados

e rejeitos de beneficiamento de minerais como nos processos de bio deterioração (corrosão microbiana).

A importância econômica da pesquisa destes organismos relaciona-se principalmente com o fato dos Thiobacillus acidófilos estarem associados a destruição de estruturas de concreto e a corrosão de metais. Assim, T.thiooxidans que cresce otimamente em pH 2,0 a 4,0 e mesmo em pH 1,0, destrói tubulações de concreto de redes de esgoto, construções portuárias, pilares de pontes, devido à alta produção de ácido sulfúrico. Um papel similar é desempenhado por outras espécies do gênero Thiobacillus como o T.thioparus e T.ferrooxidans. Nas tubulações de concreto de redes de esgoto, o sulfeto de hidrogênio produzido em anaerobiose por bactérias redutoras do sulfato se difunde para a atmosfera acima do fluxo do esgoto e entra em solução nas gotículas de água de condensação formadas na parede superior da tubulação. Nessas gotículas, os Thiobacillus rapidamente oxidam o sulfeto a ácido sulfúrico, iniciando, assim a destruição da tubulação.

Um enfoque especial tem sido dado, nos últimos tempos, ao estudo de T.ferrooxidans que se encontra amplamente distribuído em águas ácidas associadas a depósitos de minérios contendo enxofre e a minas de carvão betuminoso. A elucidação de seu metabolismo oxidativo com formação de ácido sulfúrico e íons ferrosos em solução levou à utilização destas bactérias na extração de metais a partir de certos minérios. Em 1961, foi relatada uma operação em que resíduos de uma mina, contendo apenas traços de cobre e acumulando cerca de 200 000 toneladas por dia, foram lixiviados empregando-se uma solução rica em T.ferrooxidans. Em 1958, o mesmo processo já fora empregado para lixiviar minérios de cobre, molibdênio, zinco, cromo e titânio. A oxidação microbiológica destes minérios, enquanto benéfica para a extração de metais, apresenta um efeito nefasto, contribuindo para a poluição de cursos d'água, através da drenagem de águas ácidas de minas de carvão. Nessas minas, os minérios pirita e marcassita normalmente ocorrem associados ao carvão de pedra e, após sua remoção, a oxidação biológica associada à oxidação química desses minerais, leva à formação de ácido sulfúrico e depósitos de lodo vermelho a marrom-avermelhado, que, associados à água drenada dessas minas, causam um problema muito sério de poluição em corpos d'água.

## 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para determinação do número mais provável (NMP) de Thiobacillus, através da técnica de tubos múltiplos, em águas doces (superficiais ou subterrâneas), salobras, salinas e em águas residuárias industriais, principalmente em estudo para investigar problemas de corrosão.

## 2 NORMAS E DOCUMENTO COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia
- L5.216 - Controle da qualidade de meios de cultura
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

## 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.9.

### 3.1 Gênero Thiobacillus

Bacilos Gram-negativos, com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro por 1,0 a 4,0 µm de comprimento. Algumas espécies são móveis por flagelo polar. Obtêm energia a partir da oxidação de um ou mais compostos reduzidos do enxofre, incluindo sulfetos, enxofre, tiosulfatos, politionatos e tiocianatos. O principal produto de oxidação é o sulfato, mas enxofre, sulfito ou politionatos podem também ser formados. Uma espécie obtém energia da oxidação do ferro ferroso a ferro férrico. A maioria dos Thiobacillus são quimiolitotróficos obrigatórios e dependem da fixação de CO<sub>2</sub>. O gênero inclui microrganismos aeróbios obrigatórios e denitrificantes facultativos. Crescem em pH de 2 a 8 e temperatura de 20°C a 40°C.

### 3.2 Thiobacillus thioparus

Bacilos Gram-negativos, aeróbios, usualmente com 0,5 µm de diâmetro por 1,7 µm de comprimento, móveis por flagelo polar. Quimiolitotróficos obrigatórios e autotróficos, crescem em pH de 4,5 a 7,8 (ótimo 6,6 - 7,2), temperatura de 28°C, em meio mineral com tiosulfato como única fonte de energia. Sais de amônio e nitratos são usados como fonte de nitrogênio. É encontrado em lodo, solo, canais e fontes de água.

### 3.3 Thiobacillus ferrooxidans

Bacilos Gram-negativos, ocorrendo isolados ou em pares, com 0,5 µm de diâmetro por 1,0 µm de comprimento. Quimiolitotróficos obrigatórios e autotróficos, móveis por flagelo polar. Oxidam ferro ferro

so, pirita, numerosos minérios de sulfeto, enxofre, tiosulfato ou tetrionato. Não utilizam a glicose como fonte de energia para seu crescimento e são aeróbios estritos. Sais de amônio e, provavelmente, nitrato são usados como fonte de nitrogênio. Temperatura ótima de 30°C, sendo a temperatura limite para o crescimento de 10°C a 37°C (não crescem a 42°C). Acidófilos, com pH ótimo em torno de 2,5, sendo o pH limite para o crescimento de 1,3 e 4,5. Isolados em locais com grande quantidade de ferro oxidável, minerais de sulfeto e enxofre, em particular nas águas de drenagem ácidas de minas de carvão e minerais de sulfeto.

### 3.4 Thiobacillus thiooxidans

Bacilos Gram-negativos, ocorrendo isolados, aos pares ou em cadeias curtas, com 0,5 µm de diâmetro por 1,0 a 2,0 µm de comprimento. Aeróbios estritos, móveis por flagelo polar. Não oxidam o ferro ou pirita. Quimiolitotróficos obrigatórios e autotróficos, oxidam rapidamente enxofre elementar. Usam o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e crescem em temperatura ótima de 28°C a 30°C. Acidófilos, com pH ótimo de 2,0 a 3,0; podendo se desenvolver na faixa de pH de 0,5 à 5,5. Isolados de solos, nascentes sulfurosas, águas de drenagem ácidas de minas, concreto e ferro corroídos; amplamente distribuídos em ambientes ácidos com enxofre elementar ou compostos reduzidos do enxofre.

### 3.5 Autotróficos

Microrganismos que utilizam para seu crescimento CO<sub>2</sub> como fonte principal de compostos orgânicos.

### 3.6 Quimiolitotróficos

Microrganismos capazes de obter energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos.

### 3.7 Número mais provável (NMP)

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.

### 3.8 p.a.

Para análise.

### 3.9 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

## 4 APARELHAGEM

## 4.1 Materiais e 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 103 393 Pa (15 psi ou 1,054 kgf/cm<sup>2</sup>), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve ser operada de maneira que todo o ar existente na câmara seja substituído por vapor. 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 de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.<sup>1</sup>

### 4.1.3 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura na faixa de 44°C a 46°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada.

### 4.1.4 Bico de Bunsen

### 4.1.5 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana,<sup>2</sup> cuja condutividade deve ser inferior a 2 µS/cm a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

### 4.1.6 Estufa para esterilização e secagem

A estufa 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

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento. Sua aferição deve ser feita periodicamente.

2 A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal.

temperatura de 170°C a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à 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: 20°C 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, deve ser colocado 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 deverá manter 75% a 85% de umidade relativa e ser colocada em local 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.

### 4.2 Materiais

#### 4.2.1 Balões volumétricos

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro, capacidade de 100 mL e 1L.

#### 4.2.2 Béquer

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro, com capacidade de 1L.

#### 4.2.3 Estantes

De arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e 16 mm x 150 mm.

#### 4.2.4 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampa de rosca, que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com graduação para  $(90 \pm 2)$  mL de água de diluição, e volume total suficiente para permitir uma boa homogeneização, quando se efetuar

a agitação.

#### 4.2.5 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.

#### 4.2.6 Frascos de Erlenmeyer

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro, com capacidade de 250 mL e 1L.

#### 4.2.7 Materiais para preparação de meios de cultura

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

#### 4.2.8 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel Kraft. São esterilizadas por calor seco a uma temperatura de 170°C a 180°C, durante duas horas.

#### 4.2.9 Placas de Petri

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

#### 4.2.10 Tela de amianto

Com dimensões de 22 cm x 22 cm.

#### 4.2.11 Tripé

#### 4.2.12 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.

### 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

#### 5.1 Princípio do método

5.1.1 A determinação do NMP de Thiobacillus em uma dada amostra é efetuada a partir da aplicação da técnica de tubos múltiplos. Essa técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas umas das outras por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas individuais, uniformemente



distribuídas na amostra original e 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 semeadura 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 pesquisadoras (NMP), através da aplicação de cálculo de probabilidade. Para análises de águas, 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.

## 5.2 Reagentes

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

- . ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) p.a.;
- . ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) p.a.;
- . ágar;
- . cloreto de amônio ( $NH_4Cl$ ) p.a.;
- . cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) p.a.;
- . cloreto de cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) p.a.;
- . cloreto de magnésio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) p.a.;
- . cloreto de manganês ( $MnCl \cdot 4H_2O$ ) p.a.;
- . cloreto de potássio ( $KCl$ ) p.a.;
- . enxofre elementar ( $S^0$ );
- . fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) p.a.;
- . fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) p.a.;
- . hidróxido de sódio ( $NaOH$ ) p.a.;
- . molibdato de amônio [ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ] p.a.;
- . nitrato de cálcio [ $Ca(NO_3)_2$ ] p.a.;
- . sulfato de amônio [ $(NH_4)_2SO_4$ ] p.a.;
- . sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ) p.a.;
- . sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) p.a.;
- . sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) p.a.;
- . sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) p.a.;
- . tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ) p.a.;
- . verde de bromocresol;
- . vermelho de fenol.

5.2.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico de procedência

idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos, bem como de carboidratos inespecíficos.

### 5.3 Meios de cultura

#### 5.3.1 Meio 9K modificado em concentração simples para Thiobacillus ferrooxidans

##### Fórmula:

Solução 1 (sais de base).....	700 mL
Solução 2 (fonte de energia).....	300 mL

##### Preparo:

Este meio deve ser preparado como segue:

- a) preparar a solução 1 (sais de base) com a seguinte composição:

Sulfato de amônio $[(NH_4)_2SO_4]$ .....	3,00 g
Cloreto de potássio (KCl).....	0,10 g
Fosfato de potássio dibásico $(K_2HPO_4)$ .....	0,50 g
Sulfato de magnésio $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ .....	0,50 g
Nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2]$ .....	0,01 g
Ácido sulfúrico $(H_2SO_4 - 10N)$ .....	1,00 mL
Água destilada.....	700,0 mL
pH final após esterilização: 2,8 a 3,0	

Para o preparo dessa solução, pesar os reagentes e acrescentar 700 mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 2,8 a 3,0. Esterilizar por aquecimento, agitando frequentemente até a ebulição. Evitar aquecimento excessivo. Após a esterilização por calor, colocar em banho-maria a 55°C para estabilização da temperatura do meio de cultura.

- b) preparar a solução 2 (fonte de energia) com a seguinte composição:

Sulfato ferroso $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ .....	44,22 g
Água destilada.....	300,0 mL

Para esse preparo, pesar 44,22 g de sulfato ferroso, colocar em um balão volumétrico de 300 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até completa dissolução do sulfato ferroso e esterilizar por filtração em membrana com porosidade de 0,20  $\mu m$ .

- c) juntar as soluções 1 e 2 e, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volume de 10 mL em tubos de ensaio esté

reis tamponados de 16 mm x 150 mm.

- d) os tubos de ensaio, contendo o meio 9K modificado, com concentração simples, podem ser armazenados sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

5.3.2 Meio 9K modificado em concentração dupla para Thiobacillus ferrooxidans

Fórmula:

Solução 1 (sais de base).....	700 mL
Solução 2 (fonte de energia).....	300 mL

Preparo:

Este meio deve ser preparado como segue:

- a) preparar a solução 1 (sais de base), com a seguinte composição:

Sulfato de amônio $[(NH_4)_2SO_4]$ .....	6,00 g
Cloreto de potássio (KCl).....	0,20 g
Fosfato dibásico de potássio $(K_2HPO_4)$ .....	1,00 g
Sulfato de magnésio $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ .....	1,00 g
Nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2]$ .....	0,02 g
Ácido sulfúrico $(H_2SO_4 - 10N)$ .....	2,00 g
Água destilada.....	700,0 mL
pH final após esterilização: 2,8 a 3,0	

Para o preparo dessa solução, pesar os reagentes e acrescentar 700 mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 2,8 a 3,0. Esterilizar por aquecimento, agitando freqüentemente até a ebulição. Evitar aquecimento excessivo. Após a esterilização por calor, colocar em banho-maria a 55°C para estabilização da temperatura do meio de cultura.

- b) preparar a solução 2 (fonte de energia), com a seguinte composição:

Sulfato ferroso $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ .....	88,44 g
Água destilada.....	300,0 mL

Para esse preparo, pesar 88,44 g de sulfato ferroso, colocar em um balão volumétrico de 300 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até completa dissolução do sulfato ferroso e em seguida esterilizar por filtração em membrana com porosidade de 0,20  $\mu$ m.

- c) juntar as soluções 1 e 2, com todos os cuidados de asepsia, distribuir volume de 10 mL, em tubos de ensaio esté

reis tamponados de 18 mm x 180 mm.

- d) os tubos de ensaio, contendo o meio 9K modificado, concentração dupla, podem ser armazenados sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

5.3.3 Meio de Postgate modificado em concentração simples para Thiobacillus thioparus

Fórmula:

Tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	5,00 g
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).....	1,00 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	3,00 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).....	0,10 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ).....	0,50 g
Solução de traços de elementos.....	1,00 mL
Vermelho de fenol.....	0,018 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 7,4	

Preparo:

Pesar todos os reagentes, exceto a solução de traços de elementos, e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Estabilizar o meio a temperatura de  $45^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$  e juntar 1,0 mL da solução estéril de traços de elementos recentemente preparada (ver 5.4.1). Distribuir assepticamente, com agitação constante, volumes de 10 mL, em tubos de ensaio estéreis de 16 mm x 150 mm. Armazenar sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

5.3.4 Meio de Postgate modificado em concentração dupla para Thiobacillus thioparus

Fórmula:

Tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	10,00 g
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).....	2,00 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	6,00 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).....	0,20 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ).....	1,00 g
Solução de traços de elementos.....	2,00 mL

Vermelho de fenol.....	0,036 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 7,4	

Preparo:

Pesar todos os reagentes, exceto a solução de traços de elementos, e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio a temperatura de 45°C a 50°C e juntar 1,0 mL da solução estéril de traços de elementos, recentemente preparada (ver 5.4.1). Distribuir assepticamente com agitação constante, volumes de 10 mL, em tubos de ensaio estéreis de 18 mm x 180 mm. Armazenar sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

### 5.3.5 Meio de Postgate modificado com verde de bromocresol em concentração simples para Thiobacillus thiooxidans

Fórmula:

Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	5,00 g
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).....	1,00 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	3,00 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).....	0,10 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ).....	0,50 g
Solução de traços de elementos.....	1,00 mL
Vermelho de fenol.....	0,018 g
Verde de bromocresol.....	0,01 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 4,5	

Preparo:

Pesar os reagentes, exceto a solução de traços de elementos e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 4,5 com solução 10N de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ -10N). Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após esterilização, manter a solução preparada em banho-maria de 45°C a 50°C e acrescentar 1 mL da solução de traços de elementos. Homogeneizar e distribuir com todos os cuidados de assepsia, volumes de 10 mL em tubos de ensaio estéreis de 16 mm x

150 mm. Após distribuição do meio nos tubos, usando a extremidade de uma faca, adicionar a quantidade de traços de enxofre elementar estéril em cada um dos tubos. Armazenar sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

Nota: A esterilização do enxofre elementar é feita em vapor flutuante por 30 minutos em três dias consecutivos.

#### 5.3.6 Meio de Postgate modificado em verde de bromocresol em concentração dupla para Thiobacillus thiooxidans

##### Fórmula:

Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	10,00 g
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).....	2,00 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	6,00 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).....	0,20 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ).....	1,00 g
Solução de traços de elementos.....	2,00 mL
Vermelho de fenol.....	0,036 g
Verde de bromocresol.....	0,020 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 4,5	

##### Preparo:

Pesar os reagentes, exceto a solução de traços de elementos e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 4,5 com solução 10N de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ -10N). Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após esterilização, manter a solução preparada em banho-maria de  $45^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$  e acrescentar 1 mL da solução de traços de elementos. Homogeneizar e distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de 10 mL em tubos de ensaio estéreis de 18 mm x 180 mm. Após distribuição do meio nos tubos, usando a extremidade de uma faca, adicionar a quantidade de traços de enxofre elementar estéril em cada um dos tubos. Armazenar sob refrigeração, durante o período de 2 semanas.

#### 5.4 Soluções

##### 5.4.1 Solução de traços de elementos (Solução usada na composição do meio de Postgate modificado)

##### Fórmula:

Ácido bórico ( $H_3Bo_3$ ).....	2,90 g
Cloreto de magnésio ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ).....	1,80 g
Sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ).....	0,20 g
Molibdato de amônio [ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ].....	0,03 g
Cloreto de cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ).....	0,08 g
Sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ).....	1,90 g
Sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ).....	0,10 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar. Aquecer lentamente até completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar por filtração, em membrana com porosidade de 0,20  $\mu$ m. Armazenar em frasco escuro, bem vedado e sob refrigeração.

5.4.2 Água de diluiçãoFórmula:

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

Preparo:

A água de diluição deve ser preparada como segue:

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

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

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

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

Cloreto de magnésio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ).....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes

que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira.

- c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B e completar o volume para um litro com água destilada;
- d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a 121°C durante 15 minutos, volumes de  $90 \pm 2$  mL.

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.

#### 5.4.3 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)

##### Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH).....	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 de 1 000 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até a completa dissolução do hidróxido de sódio. Armazenar em frasco bem vedado.

### 5.5 Reações

#### 5.5.1 Meio 9K modificado

O meio 9K modificado é o meio de enriquecimento seletivo para Thiobacillus ferrooxidans. Neste meio de cultura o sulfato ferroso é a única fonte de energia presente e o crescimento bacteriano a partir de sua utilização é evidenciado por um precipitado vermelho-acastanhado e um decréscimo de pH.

#### 5.5.2 Meio de Postgate modificado

O meio de Postgate modificado é um meio de enriquecimento seletivo para Thiobacillus thioparus. Estas bactérias oxidam o tiosulfato contido no meio de cultura a sulfato, ácido sulfúrico e enxofre elementar. O enxofre formado precipita-se, dando uma cor amarelo-ouro, enquanto que o ácido sulfúrico determina a acidificação do meio, o qual é evidenciado pela coloração amarela decorrente da viragem do indicador de pH (vermelho de fenol).



### 5.5.3 Meio de Postgate modificado com verde de bromocresol

O meio de Postgate modificado com verde de bromocresol é um meio de enriquecimento seletivo para Thiobacillus thiooxidans. Neste meio de cultura o enxofre elementar é usado como fonte de energia e o crescimento bacteriano a partir de sua utilização é evidenciado pela precipitação do enxofre elementar e pelo abaixamento do pH pela formação do  $H_2SO_4$ , o qual é evidenciado pela coloração amarela decorrente da viragem do indicador do pH (verde de bromocresol).

### 5.6 Amostragem

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

#### 5.6.1 Amostra

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

5.6.1.1 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 8 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.

### 5.7 Procedimento a partir de amostras líquidas

5.7.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes da mesma a serem inoculados, em função de sua procedência.

Nota: A técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1 mL da amostra, sendo cada volume inoculado em uma série de 5 tubos. A seleção desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de tiobacilos presentes na amostra ou em dados prévios sobre a mesma), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado na última série selecionada forneça resultado negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável, para amostras desconhecidas, a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.

5.7.2 Submeter a amostra a análise, conforme especificado em 5.7.3 a 5.7.17.

5.7.3 Preparar os tubos com os meios requeridos para cada uma das provas, como segue:

- Meio 9K modificado para Thiobacillus ferrooxidans.
- Meio de Postgate modificado para Thiobacillus thioparus.
- Meio de Postgate modificado com verde de bromocresol para Thiobacillus thiooxidans.

Dispô-los em três estantes, uma para cada meio, em fileiras de 5 tubos.

Nota: Usar os respectivos meios em concentração dupla para a inoculação das porções de 10 mL da amostra e, em concentração simples, para os demais volumes.

5.7.4 Proceder à identificação dos tubos, anotando, no primeiro tubo à direita na primeira fileira, o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado em cada tubo das mesmas.

5.7.5 Homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando ângulo de, aproximadamente,  $45^{\circ}$  entre o braço e antebraço.

5.7.6 Com uma pipeta esterilizada de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, antecipadamente identificado. Prepare-se, assim, a 1ª diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra (ver Figura 1).

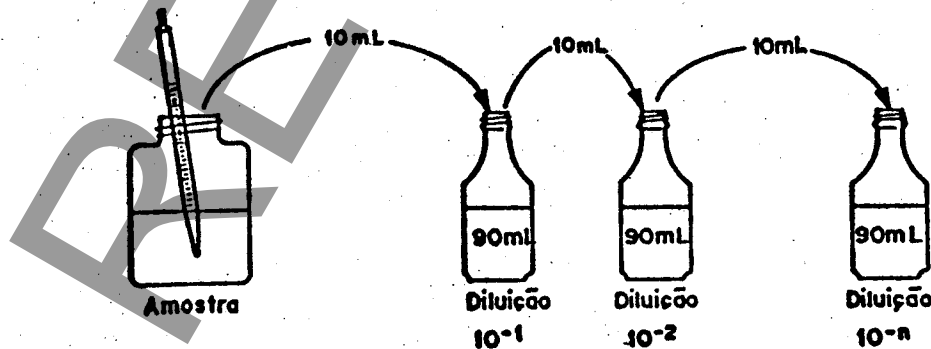


FIGURA 1 - Preparo das diluições decimais

5.7.7 Com a mesma pipeta, semear 10 mL da amostra em cada um dos tubos contendo os meios em concentração dupla, quando este volume for requerido para o teste (ver Figura 2).

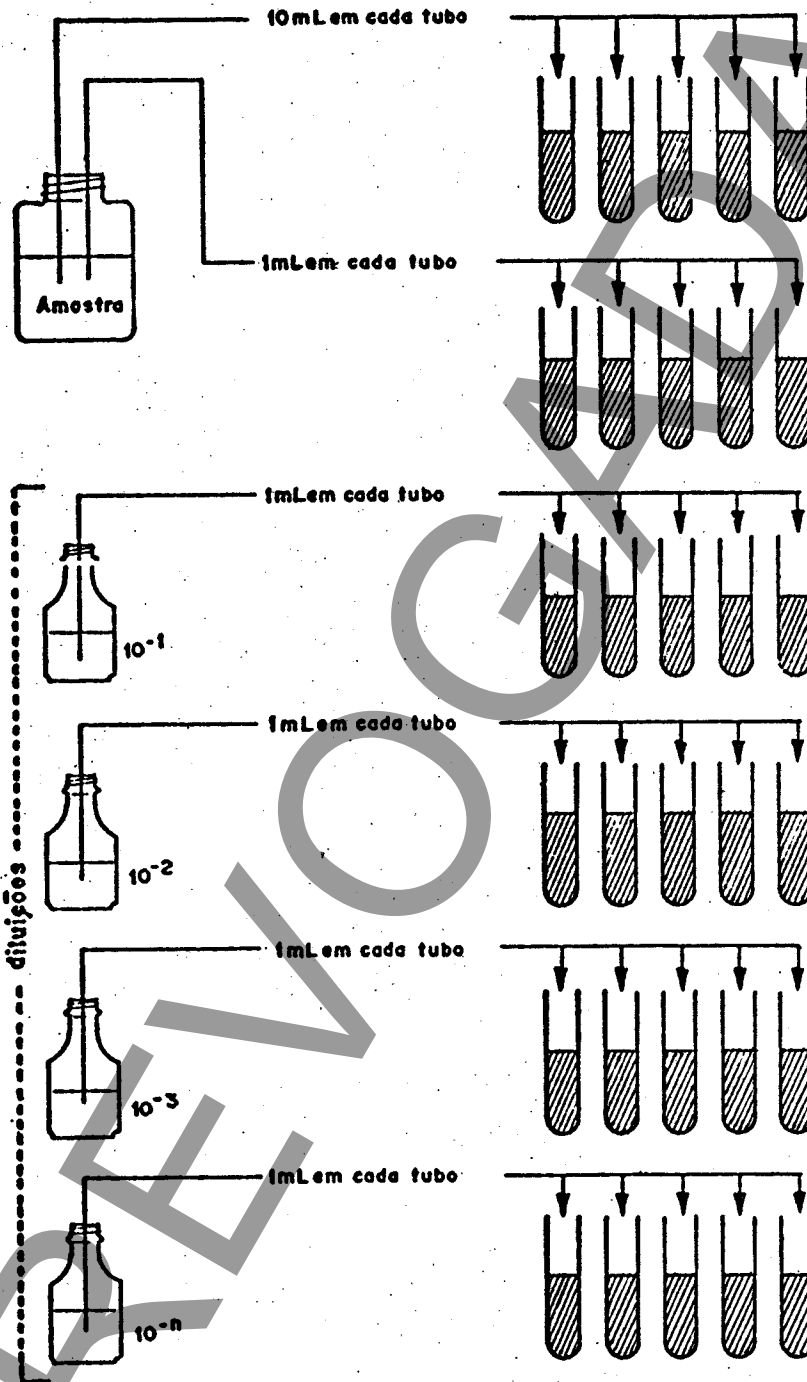


FIGURA 2 - Inoculação dos volumes da amostra e suas diluições decimais

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

5.7.9 Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) como em 5.7.5 e, com uma nova pipeta esterilizada, transferir 10 mL para um frasco contendo  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,01 mL da amostra.

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

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

5.7.12 Agitar vigorosamente, 25 vezes, o frasco com a última diluição efetuada e, com uma pipeta estéril de 5 mL, semear 1 mL da diluição em cada um dos tubos contendo os meios em concentração simples, correspondentes a essa diluição.

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

Nota: A Figura 2 sumariza o procedimento relativo à inoculação dos volumes da amostra e suas diluições decimais.

5.7.14 Após a inoculação de todos os meios e volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o exame, colocar as estantes contendo os tubos inoculados, em incubadora a  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante  $21 \pm 2$  dias.

5.7.15 Após esse período de incubação, retirar as estantes com os tubos da incubadora, para efetuar a leitura dos resultados. Comparar com os tubos-controle.

5.7.16 Considerar positivos os tubos que apresentaram, para cada um dos meios abaixo relacionados, as seguintes reações:

- Meio 9K modificado: reações positiva para Thiobacillus ferrooxidans é indicada por um precipitado vermelho-acastanhado e decréscimo do pH.
- Meio de Postgate modificado: reação positiva para Thiobacillus thioparus é indicada por um depósito amarelo do enxofre elementar e pela acidificação do meio de cultura, evidenciada pela mudança da coloração do indicador de pH de ver

melha para amarela.

- Meio de Postgate modificado com verde de bromocresol: reação positiva para Thiobacillus thiooxidans é indicada por um precipitado amarelo-claro, do enxofre elementar e pela acidificação do meio de cultura, evidenciada pela mudança da coloração do indicador de pH de verde para amarela.

5.7.17 Anotar os resultados e calcular o NMP para Thiobacillus ferrooxidans, Thiobacillus thioparus e Thiobacillus thiooxidans.

5.8 Procedimento a partir de amostras sólidas ou semi-sólidas (solo e resíduos sólidos)

5.8.1 Proceder da mesma forma que em 5.7.3 e 5.7.4.

5.8.2 Homogeneizar a amostra e transferir uma quantidade significativa para um béquer com capacidade de 1 000 mL.

5.8.3 Macerar a amostra previamente selecionada e, se necessário, retirar, com auxílio de uma pinça, pedaços de madeira, papel, pedra, etc.

5.8.4 Pesar 200 g da amostra já macerada e homogeneizada e transferir para um balão contendo 1 800 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;

5.8.5 Homogeneizar a amostra contida no balão em agitador de aproximadamente 120-150 oscilações por minuto durante cerca de 30 minutos.

5.8.6 Após a homogeneização da amostra, proceder conforme 5.7.6 a 5.7.17.

Nota: Quando as amostra são de solo ou resíduos sólidos (amostras sólidas ou semi-sólidas), recomenda-se usar a correção para a quantidade de água presente na amostra, expressando o resultado em gramas de peso seco.

## 6 RESULTADOS

6.1 Cálculo do número mais provável (NMP/100 mL)

6.1.1 A densidade de Thiobacillus é expressa como NMP de Thiobacillus por 100 mL ou 100 g, o qual é obtido através de tabelas, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

6.1.2 A Tabela 1 apresenta 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 se refiram mais especificamente a amostras pouco poluídas, esta Tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas. Para a obtenção do NMP de Thiobacillus o código é composto a partir dos tubos com resultado positivo no meio utilizado.

### 6.1.3 Utilização da Tabela 1

6.1.3.1 Quando são inoculadas 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 1. 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. Considerem-se os exemplos que se seguem na Tabela 2, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

6.1.3.2 Quando são inoculadas apenas três séries de 5 tubos, sendo utilizados volumes decimais diferentes daqueles indicados na Tabela 1, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor do NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

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

Consideram-se os seguintes exemplos (vide Tabela 3).

6.1.3.3 Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados, para a composição do código são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a três 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 apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subseqüentes 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 é obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

Valor do NMP correspondente ao código x  $\frac{10}{\text{maior volume inoculado selecionado para compor o código}}$

Exemplo: (vide Tabela 4).

#### 6.1.3.4 Casos especiais

- a) se menos que três das diluições inoculadas apresentam 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 da Tabela 5);
- b) se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos adicionado ao nº de tubos positivos da diluição mais alta escolhida para compor o código (ver Exemplo 2 da Tabela 5);
- c) 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 com resultado positivo nos cinco tubos, seguido do nº de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver Exemplo 3 da Tabela 5);
- d) se todos os tubos correspondentes a todas as diluições inoculadas apresentarem resultados positivos, selecionar para a composição do código as três maiores diluições (ver Exemplo 4 da Tabela 5);
- 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 na Tabela 5).

## 6.2 Expressão dos resultados

6.2.1 Para amostras líquidas, expressar os resultados como:

- a) NMP/100 mL de Thiobacillus thioparus;
- b) NMP/100 mL de Thiobacillus thiooxidans;
- c) NMP/100 mL de Thiobacillus ferrooxidans.

6.2.2 Para amostras sólidas ou semi-sólidas os resultados são expressos em gramas:

Tabela 1 - Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL em séries de 5 tubos

Número de tubos com reação positiva quando são utilizados, em séries de 5 tubos, inóculos de:			Índice de NMP/100mL	Limites de confiança de 95%	
10 mL	1 mL	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	1	0	4	1	15
1	1	1	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	25
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) NMP/100 g. de Thiobacillus thioparus;
- b) NMP/100 g de Thiobacillus thiooxidans; e
- c) NMP/100 g de Thiobacillus ferrooxidans.

6.2.3 Quando usado o fator de correção para a quantidade de água (umidade) presente nas amostras sólidas ou semi-sólidas (solo e resíduos sólidos), expressar o resultado como NMP/g de peso seco (ver Anexo B).

---

/TABELAS 2, 3 e 4

REVOGADA

TABELA 2 - Exemplos

Exemplos	Número 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	≥ 1 600

Tabela 3 - Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número 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 <sup>0</sup> ) mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL				
100-10 <sup>-1</sup>	5	4	0					540	130	130 x $\frac{10}{100}$	13
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-2</sup>			5	0	0			500	23	23 x $\frac{10}{1}$	230
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-3</sup>				4	1	0		410	17	17 x $\frac{10}{0,1}$	1700
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-4</sup>					3	0	0	300	8	8 x $\frac{10}{0,01}$	8000

Tabela 4 - Exemplos

Volumes decimais inoculados (mL)	Número 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 <sup>0</sup> mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL	10 <sup>-6</sup> mL				
10 a 10 <sup>-2</sup>	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	-	-	-	-	531	110	110 x $\frac{10}{1}$	1,1 x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>0</sup> a 10 <sup>-4</sup>	-	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	-	-	521	70	70 x $\frac{10}{0,1}$	7,0 x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-5</sup>	-	-	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	-	520	50	50 x $\frac{10}{0,001}$	5,0 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	23 x $\frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 <sup>5</sup>

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

REVOGADA

TABELA 5 - Exemplos

Exemplos	Volumes decimais inoculados	Nº de tubos com resultados positivos, em cada serie de 5 tubos, inoculados com:							Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP / 100 mL
		10 <sup>0</sup> mL	1(10 <sup>0</sup> ) mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL				
1	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-3</sup>	4	1	0	0	0	0	410	17	$17 \times \frac{10}{1}$	170	
2	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-5</sup>	5	5	4	1	1	0	542	220	$220 \times \frac{10}{0,1}$	$2,2 \times 10^4$	
3	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>-4</sup>	4	5	4	0	0	0	540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	$1,3 \times 10^3$	
4	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-5</sup>	5	5	5	5	5	5	555	≥ 1600	$\geq 1600 \times \frac{10}{0,001}$	$\geq 1,6 \times 10^7$	
5	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	000	< 2	$< 2 \times \frac{10}{0,1}$	< 200	

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO  
DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE THIOBACILLUS THIOPARUS  
E THIOBACILLUS THIOOXIDANS

Alguns autores utilizam meios alternativos ao meio de Postgate modificado para Thiobacillus thioparus e meio de Postgate modificado com verde de bromocresol para Thiobacillus thiooxidans, tais como o meio sulfato-redutor Thiobacillus thioparus e o meio de enxofre Thiobacillus thiooxidans recomendados por "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater".

São apresentadas a seguir, as recomendações relativas à composição e preparo desses meios de cultura.

A-1 Meio sulfato-redutor (Thiobacillus thioparus)

Fórmula:

Tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).....	10,0 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	2,0 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,1 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,1 g
Sulfato de amônio ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	0,1 g
Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,02 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH após esterilização: $7,8 \pm 0,1$	

Preparo:

Pesar todos os reagentes, exceto o tiossulfato de sódio e o sulfato de amônio. Acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando frequentemente, até dissolução completa do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,8. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Separadamente, esterilizar o tiossulfato de sódio e o sulfato de amônio e adicionar ao meio na hora do uso. Distribuir assepticamente, com agitação constante, volumes de 10 mL, em tubos estéreis de 16 mm x 150 mm (concentração simples) e tubos estéreis de 18 mm x 180 mm (concentração dupla). A reação positiva é indicada pela turvação no meio, precipitação de enxofre e decréscimo de pH.

A-2 Meio de enxofre (Thiobacillus thiooxidans)

Fórmula:

Enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ).....	10,0 g
---	--------

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	3,0 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,5 g
Sulfato de amônio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ].....	0,3 g
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,25 g
Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,02 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final após esterilização: 4,8

Preparo:

Pesar todos os reagentes, exceto o enxofre elementar. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer agitando, frequentemente, até a completa dissolução do meio. Pesar o enxofre elementar em frascos de Erlenmeyer de 250 mL usando 1 g/frasco. Adicionar 100 mL do meio em cada um dos frascos de Erlenmeyer contendo 1 g do enxofre elementar e esterilizar em vapor intermitente (30 minutos por 3 dias consecutivos). Distribuir assepticamente, com agitação constante, volumes de 10 mL em tubos estéreis de 16 mm x 160 mm (concentração simples) e tubos estéreis de 18 mm x 180 mm (concentração dupla). A reação positiva para T.thiooxidans é indicada por um precipitado castanho-alaranjado, turbidez e mudança de pH.

/ANEXO B

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORGEM GERALB-1 Obtenção de resíduo total (peso seco) para o cálculo de NMP/g

Pesar uma porção homogênea da amostra de volume adequado em uma cápsula de material apropriado, previamente tarado. Para tara deixar a cápsula em mufla a 550°C por uma hora. Em seguida, colocar a cápsula com a amostra em estufa de 103 a 105°C por uma noite. Deixar esfriar em dessecador e, assim que esfriar completamente (obtenção de peso constante), pesar e anotar o peso encontrado. A diminuição de peso em relação ao peso da cápsula com a amostra úmida corresponden ao resíduo total. A expressão do resíduo total é:

$$\% \text{ resíduo ou peso seco} = \frac{M_2 \times 100}{M_1}$$

onde:

$M_2$  = peso do resíduo total (g)

$M_1$  = peso da amostra (g)

Ver Norma CETESB L5.149 - Determinação de resíduos em água - Método gravimétricos.

B-2 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

B-3 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de culturas 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 - Prova de adequabilidade da água destilada.

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 Thiobacillus. Ver Norma CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.



REVOGADA

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, part 9000. p. 1-227.
- C-2 BROCK, T.D. & GUSTAFSON, J. Ferric iron reduction by sulfur-and iron-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 32 (4): 567-571, 1976.
- C-3 CETESB. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988, 150p.
- C-4 \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- C-5 \_\_\_\_\_. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- C-6 \_\_\_\_\_. Determinação de resíduos em águas - Métodos gravimétricos. São Paulo, (Norma Técnica L5.149).
- C-7 DUKTA, B. J. - Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada, Centre for Inland Waters, Burlington, Ontario, 1976.
- C-8 HARRISON, A.P. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Annual Review of Microbiology, 38: 265-292, 1984.
- C-9 \_\_\_\_\_. Genomic and physiological diversity amongst strains of Thiobacillus ferrooxidans, and genomic comparison with Thiobacillus thiooxidans. Archives of Microbiology, 131: 68-76, 1982.
- C-10 HUTCHINSON, M.; JOHNSTONE, K.I.; WHITE, D. Taxonomy of the acidophilic Thiobacilli. Journal of General Microbiology, 44: 373-381, 1986;

- C-11 KELLY, D.P. & HARRISON, A.P. Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms. Genus Thiobacillus Beijerinck 1904 b, 597<sup>AL</sup>. In: STALEY, J.T. et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins 1989, V. 3; sec. 20. p. 1842-1853.
- C-12 LEATHEN, W.W.; BRALEY, S.A.; McINTIRE L.D. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal, I. Thiobacillus thiooxidans. Applied Microbiology, 1: 61-64, 1953.
- C-13 PARKER, C.D. The corrosion of concrete. I. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 23: 81-90, 1945.
- C-14 PARKER, C.D. & PRISK, J. The oxidation of inorganic compounds of sulphur by various sulphur bacteria. Journal of General Microbiology, 8: 344-364, 1953.
- C-15 RODINA, A.G. Methods of studying the sulfur cycle. In: Methods in aquatic microbiology. Baltimore, University Park Press, 1972; chapter 8. p. 323-349.
- C-16 TEMPLE, K.L. & COLMER, A.R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium. Thiobacillus ferrooxidans. Journal Bacteriological, 62: 605-611, 1951.
- C-17 VISHNIAC, W. & SANTER, M. The thiobacilli. Bacteriological Reviews, 21: 195-213, 1957.
-