





CNEN/SP

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares  
AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

# ESTUDO DA BIODETERIORAÇÃO DO CONCRETO POR *Thiobacillus*

MÁRCIA AIKO SHIRAKAWA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível Nuclear.

Orientador:  
Profa. Dra. Bárbara Maria Rzycki

São Paulo  
1994

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**ESTUDO DA BIODETERIORAÇÃO DO CONCRETO POR  
THIOBACILLUS**

**MÁRCIA AIKO SHIRAKAWA**



**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências  
na Área de Reatores Nucleares de Potência  
e Tecnologia do Combustível Nuclear**

**Orientador : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Maria Rzycki**

**SÃO PAULO**

**1994**

## Agradecimentos

*Este trabalho contou com a colaboração de várias instituições e profissionais de áreas diferentes da ciência. A parte experimental foi realizada em três laboratórios:*

- Laboratório de Microbiologia da Supervisão de Rejeitos e Descontaminação do IPEN-CNEN/SP
- Laboratório de Microbiologia da Divisão de Análises Microbiológicas da CETESB
- Laboratório de Química dos Materiais do Agrupamento de Materiais de Construção civil, Divisão de Engenharia civil do IPT

*Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e ao IPEN pela possibilidade de realizar este trabalho.*

*Várias pessoas contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho, a todas elas o meu sincero agradecimento:*

*À Dra. Bárbara Maria Rzycki (IPEN) pela orientação e oportunidade de realizar um trabalho desta natureza.*

*À Dra. Maria Alba Cincotto (POLI/USP) pelo apoio científico e moral nos momentos difíceis, pelo incentivo e constante colaboração.*

*À Maria Inês Z.Sato (CETESB) pela disponibilidade nas discussões sobre algumas questões microbiológicas.*

*À Dra. Petra Sanchez Sanchez (CETESB) por ter possibilitado a realização de boa parte do trabalho experimental no laboratório de microbiologia.*

*Ao Roberto Vicente (IPEN) pelas conversas, sempre produtivas, em momentos decisivos.*

*Ao Eng<sup>o</sup>. Vanderley M. John (IPT) pela paciência, em diversas situações, com a qual me ensinou a usar o programa Windows.*

*Ao Dr. José Roberto Rogero (IPEN) pelo apoio em várias fases.*

*Ao Dr. Osvaldo Garcia Jr. (UNESP/ARARAQUARA) pelos primeiros passos para a familiarização com *Thiobacillus*.*

*Ao Dr. George Lucki (IPEN) pela tradução de artigo em língua russa, sem a qual haveria uma lacuna no levantamento bibliográfico.*

*Ao Dr. Sérgio Massaru (I.Q./USP) pelas discussões químicas dos compostos contendo enxofre.*

*Ao Dr. Daniel Atencio (I.G./USP) pela Difração de raios-X e primeiros passos em geologia.*

*Às bibliotecárias Elaine C. Pereira, Ney Marly Moura e Maria Teresa Zawitowski (IPEN) pelo apoio bibliográfico.*

*À Luiziana F. Silva (Agrup.de Biotecnologia-IPT) por algumas observações críticas na etapa final.*

*Ao Eng. Luiz C. Urenha (Agrup.Biotecnologia-IPT) pelo incentivo inicial.*

*Aos Eng<sup>os</sup> Vera Lúcia A. Sardinha e Estevam Morinigo Jr. (SABESP) que colaboram na viabilização de algumas amostragens.*

*Aos colegas da Supervisão de Rejeitos e Descontaminação do IPEN, especialmente à Vera Lúcia K. Isiki.*

*Aos colegas do Lab. de Química dos Materiais do Agrup. de Materiais de Construção civil do IPT, especialmente à Maria Cecília Florindo e Valdecir A. Quarcioni.*

*Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da CETESB, especialmente ao Octávio Luiz Ferreira pela elaboração de alguns meios de cultura.*

*Aos meus amigos Celina, Eni, Márcia, Iraê, Neide, Marcos, Ananda, Tufik, Misefa, Gi, Éder, Bete, Stan e Chico pelo apoio sempre que foi necessário.*

*À Dra Heloísa Barbosa (ICB/USP), que por sua sensibilidade e didática no curso de Microbiologia básica para a graduação, despertou-me uma verdadeira paixão pelo universo dos microrganismos.*

*Ao Acauã por ser um grande companheiro de estrada*

*Ao meu filhão Ibyatã por me ensinar muitas coisas boas*

*À minha mãe por seu espírito de pesquisa nos fatos do cotidiano*

# ESTUDO DA BIODETERIORAÇÃO DO CONCRETO POR *THIOBACILLUS*

MÁRCIA AIKO SHIRAKAWA

## Resumo

A construção de um repositório final, no plano superficial do solo, para rejeitos radioativos de nível baixo e médio de radiação, é uma necessidade que se encontra em evolução no Brasil. Sendo o critério de durabilidade do concreto para esta finalidade, de cerca de 500 anos, é importante avaliar todos os possíveis mecanismos de deterioração. Este trabalho teve por objetivo investigar a biodeterioração do concreto por microrganismos.

Os estudos microbiológicos foram dirigidos para isolar e purificar *Thiobacillus* a partir de amostras ambientais de concreto e areia. Este gênero inclui bactérias quimiolitotróficas, reconhecidas na literatura, como extremamente agressivas ao concreto, pela produção de ácido sulfúrico resultante de seu metabolismo.

A análise microbiológica quantitativa foi realizada sobre um concreto com deterioração evidente; no qual determinou-se o número mais provável de *Thiobacillus*. Efetuaram-se também as contagens de bactérias heterotróficas e fungos. A análise qualitativa para *Thiobacillus* foi realizada sobre amostras ambientais de areia para construção civil, lodo, e eflorescência de concreto.

Após o isolamento de cinco cepas neutrofilicas e cinco cepas acidofílicas, foram efetuados testes preliminares para a identificação de *Thiobacillus*. Foram identificadas duas cepas de *Thiobacillus thiooxidans*, uma cepa de *Thiobacillus ferrooxidans* e uma cepa de *Thiobacillus thioparus*.

Desenvolveu-se um teste qualitativo para observar a capacidade de crescimento de algumas cepas, sobre meios sólidos elaborados com suspensões de materiais de construção como nutrientes. Os resultados obtidos indicaram a necessidade de se prosseguir estudos futuros sobre este tema. Propõe-se um plano de trabalho que inclui o emprego de análise microbiológica como um dos critérios para a seleção de locais para instalação de repositórios e para a seleção de materiais de construção.

# STUDY OF CONCRETE BIODETERIORATION BY *THIOBACILLUS*

MÁRCIA AIKO SHIRAKAWA

## Abstract

The construction of final shallow ground repositories for low and intermediate level radioactive wastes is an increasing need in Brazil. Due to the requirement of a service life of the concrete of about 500 years, it is important to evaluate any possible deterioration mechanism. This work intended to investigate the effect of concrete biodeterioration by microorganisms.

The microbiological research was directed in order to isolate and purify *Thiobacillus* from environment concrete and sand samples. This genus comprises well known species of bacteria regarded as extremely deleterious to concrete, due to the production of sulfuric acid that results from its metabolism.

The quantitative microbiological analysis was carried out for a concrete with evident deterioration by using the most probable number test for *Thiobacillus*. The counting of heterotrophic bacteria and fungi were also performed. Qualitative analysis of *Thiobacillus* was carried out in environmental samples of sand, slime and concrete efflorescence.

After the isolation of five neutrophilic strains and five acidophilic strains, preliminary identification test for *Thiobacillus* was performed. Through this work it was identified two strains of *Thiobacillus thiooxidans*, one strain of *Thiobacillus ferrooxidans* and one strain of *Thiobacillus thioparus*.

Qualitative tests were performed in order to evaluate the ability of the strains to grow on solid media made out of suspensions of construction materials as nutrients. The results of this work point out that further research works should be done. An outline of steps of work is proposed, including the use of microbiological analysis as one of the criteria for the selection of repository sites and for the selection of the construction materials.

## GLOSSÁRIO:

Por se tratar de estudo multidisciplinar julgou-se necessária a apresentação inicial de um glossário contendo termos técnicos de áreas pertinentes envolvidas neste trabalho.

- **Aceptor de elétrons** : substância que age recebendo elétrons numa reação de oxidação-redução.
- **Aeróbio** : organismo que utiliza oxigênio para se desenvolver.
- **Anaeróbio** : organismo que se desenvolve na ausência de oxigênio.
- **Área potencial** : área contida na área preliminar identificada como potencialmente satisfatória para abrigar um repositório para rejeitos radioativos, através da aplicação de critérios técnicos restritivos e estudos técnicos específicos.
- **Área preliminar** : área identificada dentro da região de interesse, a ser investigada para identificação de áreas potenciais.
- **ATP** : (adenosina trifosfato) ribonucleosídeo 5'trifosfato funcionando como um grupo doador de fosfato no ciclo de energia da célula.
- **Bacilo** : bactéria em forma de bastão
- **Bactérias autotróficas** : são aquelas que utilizam dióxido de carbono como única fonte de carbono, não necessitando de compostos orgânicos pré-elaborados do meio para o seu crescimento.
- **Bactéria Gram-negativa** : bactéria que pode ser classificada por técnica de coloração diferencial denominada *Método de Gram* (ver Método de Gram). As bactérias Gram-negativas possuem maior concentração de lipídeos e menor concentração de peptoglicano na parede celular do que as bactérias Gram-positivas. Essas características são consideradas como as causas mais importantes que favorecem a diferenciação desses tipos de bactérias.
- **Bactérias heterotróficas**: são as que requerem um ou mais compostos orgânicos, que não o dióxido de carbono, para a síntese de seu protoplasto.
- **Bactérias quimiolitotróficas**: são aquelas capazes de obter energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos.

- **Biofilme:** crescimento microbiano que forma uma película sobre materiais inorgânicos. Este filme é formado pela excreção de produtos extracelulares como heteropolissacarídeos ou proteínas.
- **Cadeia respiratória :** uma seqüência de substâncias transportadoras de elétrons que transfere os elétrons dos substratos até o oxigênio molecular nas células aeróbias. Em anaerobiose os íons nitrato ou sulfato podem ser os aceptores finais.
- **Cepa:** linhagem de uma espécie de microrganismo.
- **Ciclo de Calvin :** é um processo de fixação de dióxido de carbono. A reação básica é catalisada por uma enzima (carboxidismutase), na qual a ribulose difosfato atua como acceptor de CO<sub>2</sub> na formação de dois moles de ácido fosfoglicérico. As demais etapas do ciclo são responsáveis pela formação da glicose e regeneração da ribulose difosfato.
- **Cimento Portland composto:** aglomerante hidráulico obtido pela moagem de clínquer Portland ao qual se adiciona, durante a operação, a quantidade necessária de sulfato de cálcio. Durante a moagem é permitido adicionar a esta mistura materiais pozolânicos, escórias granuladas de alto-forno e/ou materiais carbonáticos, nos teores especificados por norma (6)
- **Cimento Portland comum:** aglomerante hidráulico obtido pela moagem de clínquer Portland ao qual se adiciona, durante a operação, a quantidade necessária de uma ou mais formas de sulfato de cálcio. Durante a moagem é permitido adicionar a esta mistura materiais pozolânicos, escórias granuladas de alto-forno e/ou materiais carbonáticos, com teores especificados por norma(5).
- **Cimento Portland de alto-forno:** aglomerante hidráulico obtido pela mistura homogênea de clínquer Portland e escória granulada de alto-forno, moidos em conjunto ou em separado(7).
- **Clínquer Portland:** produto constituído principalmente por silicatos de cálcio com propriedades hidráulicas (capacidade hidratação adquirindo resistência mecânica).
- **Durabilidade:** capacidade que um produto, componente, montagem ou construção, possui de manter seu desempenho acima dos níveis mínimos especificados, de maneira a atender às exigências dos usuários, em cada situação específica.
- **Eflorescência:** íons lixiviados, carregados para a superfície, que precipitam por evaporação da água, podendo reagir com os gases da atmosfera.

- **Escória granulada de alto-forno** : subproduto do tratamento de minério de ferro em alto-forno, obtido sob forma granulada por resfriamento brusco, constituído em sua maior parte de silicatos e aluminossilicatos de cálcio<sup>(7)</sup>.
- **Método de Gram** : processo diferencial de coloração no qual o esfregaço bacteriano fixado é tratado pelas seguintes soluções, na ordem de sua apresentação : cristal violeta (ou violeta de Genciana), solução iodo-iodetada, álcool ou álcool cetona (agente descorante) e safranina ou outro contra-corante adequado (fucsina diluída). As bactérias coradas pelo método de Gram pertencem a dois grupos: bactérias Gram-positivas que retêm o complexo cristal violeta-iodo e apresentam coloração violeta escuro e as bactérias Gram-negativas, que perdem o complexo cristal violeta-iodo e são coradas pela safranina (ou fucsina diluída), apresentando pois coloração vermelha.
- **Microbiota**: população de microrganismos de um determinado nicho
- **Pite**: corrosão localizada em diversos pontos de uma dada superfície.
- **Rejeito radioativo** : qualquer material resultante da atividade humana que contenha radionuclídeos acima dos limites de isenção especificados, pela Norma CNEN. NE 6.02 - Licenciamento de instalações radiativas, e cuja reutilização é imprópria ou não prevista.
- **Repositório final** : depósito destinado a receber, em observância aos critérios estabelecidos pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, os rejeitos radioativos provenientes de armazenagens temporárias, depósitos intermediários e depósitos provisórios.
- **Reprocessamento** : tratamento de combustível nuclear queimado para recuperação de materiais físeis e separação de radionuclídeos indesejáveis.

## **ABREVIACÕES**

**BSR = bactéria sulfato-redutora**

**CEPEUSP = Conjunto de Práticas Esportivas da Universidade de São Paulo**

**CETESB = Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**

**col. = colônia**

**ETA = estação de tratamento de gua**

**I.P.T. = Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A**

**min. = minuto**

**NMP = número mais provável**

**p.a. = para análise**

**rpm. = rotações por minuto**

**U.F.C. = unidade formadora de colônia**

## SUMÁRIO

	Pag.
Resumo.....	i
Abstrat.....	ii
Glossário.....	iii
Abreviações.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A questão da deposição dos rejeitos radioativos.....	1
1.2 Objetivos.....	7
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	8
2.1. Biodeterioração.....	8
2.1.1. Uma questão semântica.....	8
2.1.2. A biodeterioração de minerais.....	9
2.1.2.1. Biodeterioração por formação de biofilme e acúmulo de água.....	9
2.1.2.2. Biodeterioração por tensão de sais.....	10
2.1.2.3. Biodeterioração por complexação.....	10
2.1.2.4. Biodeterioração por ataque ácido.....	10
2.1.3. O ciclo do enxofre associado ao processo de corrosão microbiológica e biodeterioração.....	11
2.1.3.1. Bactérias redutoras de sulfato.....	11
2.1.3.2. Bactérias sulfoxidantes.....	12
2.1.4. Corrosão microbiológica de metais.....	16
2.1.4.1. Processo aeróbio de corrosão microbiológica.....	17
2.1.4.2. Processo anaeróbio de corrosão microbiológica.....	18
2.1.5. A ecologia da corrosão microbiológica.....	20
2.1.5.1. O papel da microbiota de superfície.....	20
2.1.5.2. Interação exopolímero-metal.....	20
2.1.5.3. O papel da associação de microrganismos.....	21
2.2. Biodeterioração do concreto.....	22

2.2.1.	Biodeterioração da matriz de cimento hidratado .....	22
2.2.1.1.	A carbonatação da matriz de cimento hidratado: .....	22
2.2.1.2.	Ação ácida na matriz de cimento hidratado .....	23
2.2.1.3.	Histórico sobre a biodeterioração do concreto .....	23
2.2.1.4.	Biodeterioração acelerada do concreto em condições laboratoriais controladas.....	26
2.2.1.5.	Atividade vital dos microrganismos no interior do concreto .....	26
2.2.1.6.	Biodeterioração do concreto por diferentes espécies de <i>Thiobacillus</i> .....	28
2.2.1.7.	Mecanismo de biodeterioração do concreto por microrganismos de vários gêneros e espécies .....	29
2.2.1.8.	Presença de microrganismos em concretos brasileiros. ....	30
2.2.1.9.	Estudo de biocidas no combate biodeterioração ....	31
2.2.2.	Corrosão microbiológica em armaduras para concreto armado .....	31
2.2.3.	Biodeterioração do concreto por microrganismos em repositórios finais para rejeitos radioativos.....	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1.	Materiais.....	34
3.1.1.	Equipamentos.....	34
3.1.2.	Materiais.....	34
3.1.3.	Reagentes.....	35
3.1.4.	Soluções.....	36
3.1.5.	Meios de cultura .....	36
3.2.	Metodologia .....	38
3.2.1.	Descrição geral dos experimentos efetuados.....	38
3.2.2.	Amostras estudadas .....	38
3.2.2.1.	Concreto deteriorado : estudo-de-caso .....	40
3.2.2.2.	Amostras coletadas do ambiente construído .....	45
3.2.2.3.	Amostras de areias para construção civil.....	46
3.2.3.	Coleta e preservação das amostras: .....	47
3.2.3.1.	Coleta das amostras.....	47

3.2.3.2. Preservação das amostras .....	47
3.3. Métodos .....	47
3.3.1. Análise microbiológica realizada em estudo-de-caso.....	47
3.3.1.1. Técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP) de <i>Thiobacillus</i> ....	48
3.3.1.2. Ensaio complementares análise microbiológica quantitativa.....	54
3.3.1.3. Contagem em placas de bactérias heterotróficas.....	54
3.3.1.4. Contagem de fungos.....	55
3.3.1.5. Teste qualitativos para bactérias redutoras de sulfato .....	56
3.3.2. Composição química da matriz (concreto/estudo-de-caso).....	56
3.3.2.1. Reconstituição de traço .....	56
3.3.2.2. Difração de raios X .....	57
3.3.3. Testes presuntivos qualitativos para <i>Thiobacillus</i> .....	57
3.3.4. Obtenção de cultura pura e identificação de <i>Thiobacillus</i> .....	57
3.3.4.1. Seleção por passagens sucessivas em meio mineral ..	58
3.3.4.2. Isolamento das colônias em meio sólido seletivo .....	59
3.3.4.3. Purificação das culturas a partir de colônias isoladas .....	59
3.3.4.4. Testes com os isolados em meios de cultura com variação do pH inicial .....	61
3.3.4.5. Curva de crescimento .....	61
3.3.4.6. Testes preliminares para identificação de <i>Thiobacillus</i> .....	61
3.3.5. Teste qualitativo para crescimento de cepas de isoladas em meios de cultura de suspensões de materiais de construção ....	65
3.3.5.1. Meio de cultura sólido contendo escória granulada de alto-forno (COSIPA) .....	65
3.3.5.2. Análise química da escória granulada de alto- forno .....	66
3.3.5.3. Meio de cultura sólido contendo matriz do concreto (estudo-de-caso).....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. Resultados obtidos em estudo-de-caso .....	69

4.1.1.	Resultados das análises microbiológicas quantitativas.....	69
4.1.2.	Resultados da análise microbiológica em períodos de coleta diferentes.....	70
4.1.3.	Resultados da análise química da matriz do concreto.....	70
4.1.4.	Discussão dos resultados.....	71
4.2.	Testes presuntivos qualitativos para <i>T. thioparus</i> .....	73
4.2.1.	Resultados dos testes presuntivos em amostras do ambiente construído.....	73
4.2.2.	Discussão dos resultados.....	74
4.3.	Testes presuntivos qualitativos para <i>T.thioparus</i> , <i>T.thiooxidans</i> e <i>T.ferrooxidans</i> .....	76
4.3.1.	Resultados dos teste presuntivos em amostras de areia.....	76
4.3.2.	Discussão dos resultados.....	78
4.4.	Isolamento e identificação preliminar para <i>Thiobacillus</i> .....	79
4.4.1.	Resultado do processo de isolamento de cepas puras.....	79
4.4.2.	Resultado do estudo do comportamento de cepas puras em meios de cultura com variação do pH inicial.....	83
4.4.2.1.	Meio líquido ATCC 238 modificado para pH inicial = 12.....	83
4.4.2.2.	Meio sólido S6 e S5.....	84
4.4.2.3.	Meio de Postgate modificado para <i>T.thioparus</i> .....	85
4.4.2.4.	Meio de Postgate modificado para <i>T. thiooxidans</i> ....	85
4.4.2.5.	Adaptações do Meio ATCC 238 em comparação com os meios de Postgate modificados para <i>T.thiooxidans</i> e <i>T.thioparus</i> .....	86
4.4.2.6.	Discussão dos resultados.....	87
4.4.3.	Resultados da curva de crescimento para observar a concentração de bactérias no inóculo para os testes de identificação.....	88
4.4.3.1.	Discussão dos resultados.....	88
4.4.4.	Resultado dos testes preliminares para identificação de <i>Thiobacillus</i> .....	90
4.4.4.1.	Discussão dos resultados.....	91
4.5.	Resultados dos testes qualitativos de crescimento de cepas isoladas em meio de cultura elaborados com suspensões de materiais de construção.....	96
4.5.1.	Discussão dos resultados.....	97

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
8. ANEXOS.....	113
ANEXO I (Soluções).....	113
ANEXO II (Meios de cultura) .....	115

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 A questão da deposição final dos rejeitos radioativos**

A utilização de radionuclídeos, em diversas áreas da ciência, biomedicina, indústria, agricultura e instalações nucleares, vem delineando uma curva ascendente da concentração de rejeitos radioativos, em função do tempo, depositados em repositórios que passam a fazer parte da biosfera. Os benefícios provenientes da energia nuclear trazem também alguns custos para a sociedade, entre eles o do gerenciamento de rejeitos radioativos gerados em cada área de aplicação.

No Brasil, os rejeitos são classificados em categorias segundo o estado físico, natureza da radiação, concentração e taxa de exposição, conforme critérios estabelecidos pela Norma Experimental "Gerência de rejeitos radioativos em instalações radiativas" (CNEN-NE 6.05)<sup>(17)</sup>. Dentro destes critérios os rejeitos são separados em níveis de radiação; desta forma, são classificados em rejeitos de nível baixo de radiação, nível médio e nível alto.

O gerenciamento dos rejeitos radioativos compreende as etapas de coleta, segregação, pré-tratamento, tratamento, acondicionamento, armazenagem temporária, transporte e deposição final em repositórios específicos<sup>(17)</sup>. O objetivo da deposição em repositórios finais é garantir o confinamento seguro destes materiais pelo tempo que se fizer necessário de forma que não apresentem efeitos prejudiciais inaceitáveis ao homem e a outras espécies de seres vivos.

Os rejeitos gerados no Brasil, até o momento, são de níveis baixo ou médio de radiação, com emissores alfa abaixo dos limites estabelecidos pela norma CNEN-NE 6.05. Em 1986 o Governo Federal decidiu adiar o reprocessamento de combustíveis nucleares. Por essa razão, não são gerados rejeitos de nível alto associados a essa etapa do ciclo do combustível<sup>(29)</sup>.

Durante décadas alguns países depositaram seus rejeitos colocando-os em cavidades rochosas, minas abandonadas ou minas escavadas com a finalidade de deposição. Além destas medidas, vários países adotaram a prática de deposição no mar para certos tipos de rejeitos de nível baixo de radiação<sup>(29)</sup>.

A prática de deposição de rejeitos no mar manteve-se sob moratória, pela Convenção para a prevenção de poluição marinha por despejo de rejeitos e outras matérias (Convention for the Prevention of Marine Pollution by Dumping of Waste and Other Matter), até que se provasse que não apresentaria riscos ao homem e ao meio ambiente. Desde 1982 os países que depositavam seus rejeitos no mar suspenderam esta prática, mantendo uma

moratória voluntária, apesar de um grupo de estudos da Agência de Energia Nuclear da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento - NEA/OECD - (Nuclear Energy Agency of the Organisation for Economic Cooperation and Development) ter concluído, em 1988, que a deposição no mar era tecnicamente exequível<sup>(15)</sup>.

Atualmente, os repositórios finais de superfície são indicados para confinar rejeitos de níveis médio e baixo de radiação com meia vida curta, enquanto os repositórios de profundidade são mais indicados para confinar rejeitos embalados, de nível alto de radiação e meia vida longa.

Nas décadas de 1940 e 1950, a prática de deposição de rejeitos radioativos de níveis médio e baixo de radiação, em trincheiras escavadas ao nível do solo, foi amplamente adotada por vários países. Porém, algumas destas trincheiras foram desativadas no Canadá<sup>(61)</sup> e nos Estados Unidos<sup>(29)</sup>, por constatar-se que em alguns destes locais, ocorreu a liberação dos radionuclídeos depositados, com migração no solo e riscos de contaminação das águas subterrâneas potencialmente utilizáveis pelo homem.

Atualmente, o conhecimento acumulado sobre o assunto indica a disponibilidade de métodos seguros, para a deposição superficial no solo, de rejeitos de nível baixo e médio de radiação. O isolamento seguro dos rejeitos radioativos depende de todo um sistema de deposição, que consiste de três grandes componentes: o local, o repositório e a embalagem do rejeito. Este conceito de sistema, implica que algumas características menos favoráveis de um dos componentes possam ser compensadas por um melhor desempenho de um outro componente, desde que seja atingido um grau desejável de isolamento do sistema como um todo<sup>(38,39)</sup>.

O repositório de superfície tem duas funções importantes:

- limitar a dispersão de radionuclídeos contidos no rejeito de tal forma que estes não excedam os limites estabelecidos ao ambiente humano; e
- proteger o rejeito de processos de deterioração como a erosão, transgressão por vegetais de raízes profundas, refúgio para animais e intrusão pelo homem.

A seleção do local adequado para se implantar um repositório, é de importância central para garantir maior segurança. Quatro fatores são considerados no processo de seleção para a escolha do local adequado<sup>(38)</sup>:

- hidrogeologia;
- ecologia;
- uso da terra; e
- fatores sócio-econômicos.

Portanto, a seleção de um local adequado para um repositório, depende de um trabalho de pesquisa amplo, que envolve disciplinas variadas, incluindo as ciências da Terra, ecologia, meteorologia/climatologia, biologia (microbiologia), geologia, engenharia civil, matemática, física e ciências sociais, entre outras.

Um princípio importante para deposição ao nível do solo é que as características hidrogeológicas naturais devem confinar os radionuclídeos, de forma que estes não venham a contaminar as águas subterrâneas potencialmente utilizáveis pelo homem<sup>(37)</sup>. Outro fator importante é que o local seja estável sob o ponto de vista geotectônico<sup>(18)</sup>.

Um local ideal é aquele cuja constituição geológica retarde a migração dos radionuclídeos até que estes decaiam a níveis aceitáveis. No entanto, estes locais são limitados na Natureza. Assim sendo, torna-se necessária a utilização de técnicas de engenharia para aumentar a retenção de radionuclídeos dentro do repositório. Os obstáculos construídos para esta finalidade são denominados barreiras de engenharia<sup>(38)</sup>.

As barreiras de engenharia podem ser efetuadas com opções variadas, objetivando prevenir a infiltração de água no rejeito e a migração de radionuclídeos para o ambiente. Três possibilidades são consideradas importantes<sup>(38)</sup>:

- melhorar as condições geoquímicas incluindo, nas áreas de deposição de rejeitos, materiais com capacidade elevada de retenção de radionuclídeos; neste caso, o material mais utilizado é a argila;
- utilizar materiais estruturais, por exemplo, o concreto, metal, plásticos e outros, para melhor isolamento do rejeito; e
- controle dos aquíferos, por um sistema artificial de drenagem das águas pluviais.

A maioria dos projetos de repositórios incluem o uso do concreto como um material de construção, sendo recomendado como uma barreira de engenharia eficiente para reduzir a infiltração de água, a erosão e a intrusão por agentes indesejáveis<sup>(37)</sup>.

No Brasil, ainda não há um local definido para a construção de um repositório para rejeitos radioativos gerados por instalações nucleares e radiativas. Um estudo inicial envolveu análises de regiões de interesse, localizadas em vários estados (Piauí, Pará, Ceará,

Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro), mas após alguns fatores de restrição, estas regiões de interesse foram reduzidas a algumas áreas candidatas. As ilhas oceânicas Martin Vaz e Trindade foram consideradas como áreas candidatas<sup>(29)</sup>.

Um levantamento feito por SUAREZ<sup>(81)</sup> previu que até o ano 2010 o volume total de rejeitos acondicionados no Brasil chegaria a 8.000 m<sup>3</sup>, além dos 3.500 m<sup>3</sup> resultantes da área contaminada após a violação de uma fonte de <sup>137</sup>Cs, em setembro de 1987 na cidade de Goiânia (GO)<sup>(81)</sup>. Os rejeitos resultantes deste acidente deverão ser depositados separadamente dos demais.

Ao considerar a previsão da quantidade de rejeitos gerados no Brasil, o nível de radiação, as condições climáticas e as alternativas para isolar estes rejeitos, evidenciou-se que a prática de deposição mais conveniente para a nossa realidade é um repositório de superfície com sistema de barreiras múltiplas<sup>(29)</sup>, consistindo de :

- embalagens dos rejeitos;
- estrutura de concreto;
- camadas de argilas;
- areia; e
- sistema de drenagem.

A durabilidade do concreto utilizado como barreira de engenharia para um repositório de superfície é estimada em 500 anos segundo a concepção canadense<sup>(64)</sup> e em 300 anos segundo a concepção francesa<sup>(67)</sup> e espanhola<sup>(93)</sup>. Para que o concreto mantenha a durabilidade por algumas centenas de anos, a sua velocidade de deterioração deve ser muito baixa. Entre os mecanismos de deterioração do concreto, as causas podem ser relacionadas a fatores intrínsecos e extrínsecos ao concreto<sup>(14)</sup>. Entre os fatores intrínsecos estão:

- reações álcali-agregados;
- tensões térmicas resultantes do calor de hidratação do cimento; e
- tensão interna por uma sobrecarga externa.

Entre os fatores extrínsecos estão:

- deterioração química por ataque de cloretos, sulfatos, ácidos orgânicos e inorgânicos e ação do gás carbônico;
- deterioração por congelamento-descongelamento; e
- ação por microrganismos

A durabilidade do concreto pode ser influenciada pelo ambiente no qual o concreto está exposto e pela qualidade dos materiais utilizados<sup>(14)</sup>.

Alguns estudos<sup>(16, 32, 50, 70)</sup> indicam a importância da contribuição dos microrganismos no processo de deterioração do concreto em repositórios para rejeitos de nível baixo de radiação e até mesmo de nível alto de radiação<sup>(61)</sup>. Supõe-se que a atividade microbiana possa atuar tanto na biotransformação do rejeito quanto na deterioração do concreto, e facilitar a migração dos radionuclídeos para águas subterrâneas potencialmente utilizáveis pelo homem. Outro fator de dispersão dos radionuclídeos do repositório para o ambiente pode ser pelo escape de gases (por exemplo, H<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> radioativos) resultantes do metabolismo microbiano sobre rejeitos orgânicos depositados.

Várias espécies de microrganismos aeróbios e anaeróbios podem estar envolvidos no processo de biodeterioração do concreto. No entanto, as bactérias do gênero *Thiobacillus* apresentam-se como as mais agressivas, por produzirem ácido sulfúrico como produto final resultante da oxidação de um ou mais compostos reduzidos de enxofre inorgânico<sup>(51, 56, 57, 58, 59, 71, 72)</sup>, merecendo, portanto, atenção especial em estudos desta natureza.

Com a preocupação de estabelecer critérios para a construção de um repositório de rejeitos radioativos e avaliar a sua segurança, a Supervisão de Rejeitos e Descontaminação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Comissão Nacional de Energia Nuclear - São Paulo (IPEN/CNEN-SP), iniciou estudos de durabilidade de barreiras de engenharia em repositórios finais para rejeitos radioativos, onde um dos enfoques é a biodeterioração do concreto, pois as condições climáticas do Brasil são favoráveis proliferação de microrganismos mesófilos (aqueles que crescem melhor s temperaturas de 25 a 40 °C).

A interação meio ambiente e microrganismos, que difere para cada nicho, torna importante conhecer a microbiota dos locais a serem escolhidos, dos materiais de construção e do ambiente construído. A interferência de cada um destes componentes no processo de biodeterioração, possivelmente resulta numa durabilidade alterada do concreto. Para se atuar em âmbito preventivo, deve-se assim, efetuar estudos que possam contribuir para o conhecimento das formas de atenuação da atividade dos microrganismos no concreto.

A abordagem de um estudo preventivo, nesta área, pode ser efetuada em várias direções:

- estudos acelerados em laboratório, da biodeterioração do concreto por bactérias de interesse, previamente isoladas;
- quantificação, isolamento e identificação de microrganismos agressivos ao concreto, no local escolhido; e

- estudo da química dos materiais de construção e sua interferência no metabolismo dos microrganismos envolvidos em processos de biodeterioração.

Os estudos acelerados da ação microbiológica sobre o concreto, efetuados em laboratório, podem contribuir, através de modelos matemáticos, para a obtenção de dados que permitam projetar concretos com a durabilidade desejada. No entanto, estes estudos têm maior significado quando efetuados com a microbiota local, que é atuante no processo específico, e não com microrganismos estranhos ao ambiente em questão.

Atualmente não é possível estudar-se a microbiota ambiental de um local específico para repositório para rejeitos radioativos, porque ainda não há local definido no Brasil.

Diante destas questões apresentadas, e por não haver dados experimentais sobre a biodeterioração do concreto no Brasil, com informações sobre a atividade vital dos microrganismos nos concretos brasileiros, este trabalho foi efetuado para obter-se dados microbiológicos ambientais em estudo-de-caso de uma estrutura de concreto apresentando deterioração evidente; de areias para construção civil, de amostras de lodo, concreto e eflorescência, coletados de diferentes procedências.

## 1.2 Objetivos

Este trabalho teve por objetivo realizar análises microbiológicas que pudessem colaborar para o estudo da biodeterioração do concreto, nas condições ambientais brasileiras, envolvendo bactérias do gênero *Thiobacillus*. Para tanto, algumas metas principais foram abrangidas:

- Realização de testes presuntivos para observar ocorrência de *Thiobacillus* em areia para construção civil, concreto e amostras diversas coletadas do ambiente construído;
- Isolamento e purificação de *Thiobacillus* com características neutrofilicas e acidofilicas;
- Estabelecimento de critérios para a identificação dos *Thiobacillus* isolados;
- Elaboração de um teste qualitativo de crescimento em meio de cultura sólido composto por uma suspensão de materiais de construção.

Os dados obtidos poderão ser utilizados como um parâmetro em pesquisas futuras, diretamente relacionadas com a prevenção da biodeterioração do concreto de repositórios finais para rejeitos radioativos.

## 2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Tendo em vista que a biodeterioração do concreto é um tema multidisciplinar ainda não estudado no Brasil, é necessário rever previamente a literatura sobre os processos de biodeterioração e corrosão microbiológica para posteriormente estudar a biodeterioração do concreto. Para tanto, este capítulo é dividido em dois blocos:

- levantamento bibliográfico sobre o fenômeno da biodeterioração, no qual são enfocadas a biodeterioração de materiais de natureza mineral e a corrosão microbiológica de metais;
- levantamento bibliográfico sobre a biodeterioração do concreto, no qual abordou-se a ação das bactérias do gênero *Thiobacillus*, a corrosão das armaduras metálicas no concreto armado por bactérias redutoras de sulfato e a biodeterioração do concreto em repositórios finais para rejeitos radioativos.

### 2.1. Biodeterioração

#### 2.1.1. Uma questão semântica

A transformação de vários tipos de materiais vem sendo associada ao metabolismo de microrganismos. Esse processo pode ser desejável ou indesejável. Algumas questões semânticas relacionadas à designação da participação dos microrganismos em processos biotecnológicos e ambientais foram discutidas no I Simpósio Latino Americano de Biodeterioração realizado em Campos do Jordão, S.P.- Brasil em 1992<sup>(47)</sup>. As biotransformações desejáveis foram definidas como biodegradação, por exemplo, a biodegradação de plásticos e resíduos industriais, enquanto que as deletérias foram definidas como biodeterioração, por exemplo, a biodeterioração de equipamentos metálicos e concreto. Este mesmo critério foi adotado por ALLSOPP<sup>(1)</sup>.

Neste trabalho adotou-se o termo biodeterioração para a deterioração do concreto associada ao ataque microbiológico, embora muitos autores utilizem o termo corrosão microbiológica do concreto. Esta distinção é mantida para evitar um equívoco com a corrosão microbiológica das armaduras metálicas do concreto armado.

O termo corrosão microbiológica é aplicado a um metal quando este apresenta danos de natureza eletroquímica correlacionados à participação de uma microbiota local <sup>(87)</sup>,

ocorrendo, portanto, na armadura de metálica do concreto. No caso do concreto (cimento hidratado-agregados) o dano mais agressivo não envolve uma reação eletroquímica, mas, uma dissolução dos componentes hidráulicos do concreto, pelos metabólitos ácidos dos microrganismos. Assim o termo biodeterioração parece ser mais adequado.

Este trabalho possui uma interface entre a microbiologia e a engenharia civil, por essa razão, elaborou-se um glossário, no qual são definidos alguns termos técnicos utilizados nesta dissertação (pp iii e v).

## **2.1.2. A biodeterioração de minerais**

Geralmente os microrganismos que vivem sobre pedras podem atuar no processo da biodeterioração. Entre eles estão as bactérias quimiolitotróficas e quimiorganotróficas, cianobactérias, fungos e líquens. Estes grupos de microrganismos contribuem significativamente para a deterioração de materiais de natureza mineral como pedras, concreto, cerâmica e vidro. SAND & BOCK <sup>(74)</sup> classificaram os mecanismos de ação da biodeterioração segundo algumas características principais:

- formação de biofilme e acúmulo de água;
- por tensão de sais;
- complexação; e
- ataque ácido.

### **2.1.2.1. Biodeterioração por formação de biofilme e acúmulo de água**

Normalmente, os microrganismos crescem podendo formar um biofilme sobre os materiais inorgânicos ou microcolônias nos poros dos materiais. As células excretam material extracelular composto por heteropolissacarídeos e proteínas. No seu metabolismo, os microrganismos podem excretar compostos como o nitrato ou ácidos orgânicos, os quais acumulam-se na microcolônia/biofilme. Alguns destes compostos são fortemente hidrofílicos retendo água em sua estrutura; conseqüentemente, o crescimento microbiano resulta em aumento do teor de água do material poroso. Os compostos dissolvidos, por serem higroscópicos, permitem apenas a evaporação parcial da água, mesmo sob condições de secura severa. O teor de água aumentado na microcolônia/biofilme é parcialmente responsável pela deterioração dos materiais em condições de ciclagem térmica, onde ocorrem fases de congelamento e descongelamento da água, o que resulta em aumento de

volume dos poros. Este tipo de biodeterioração ocorre em regiões de climas frios e é considerado fracamente agressivo ao material atacado.

#### 2.1.2.2. Biodeterioração por tensão de sais

Os ácidos são convertidos a sais por reações químicas com a matriz mineral susceptível. Sob condições de secura, a água se evapora, resultando em aumento da concentração de sais. Estes sais acumulam-se sob a superfície dos materiais, causando um estado de tensão que resulta em esfoliação da camada superficial. Este tipo de ataque é fracamente agressivo ao mineral.

#### 2.1.2.3. Biodeterioração por complexação

O ferro, potássio, manganês, magnésio, cálcio e outros metais são frequentemente fatores limitantes do crescimento microbiano, pois apresentam-se geralmente na forma insolúvel em materiais de natureza mineral. Os microrganismos podem superar esta limitação por excreção de ácidos orgânicos, que se complexam com os metais, e permitem que estes estejam biologicamente disponíveis através da conseqüente solubilização. Este tipo de ataque é fracamente agressivo aos minerais.

#### 2.1.2.4. Biodeterioração por ataque ácido

A produção biológica de ácidos minerais e orgânicos causa o ataque mais fortemente agressivo aos materiais de natureza mineral. Entre as bactérias quimiolitotróficas, que excretam ácidos inorgânicos, estão os *Thiobacillus* produtores de ácido sulfúrico, e as bactérias nitrificantes, que produzem ácido nítrico; e quase todos os microrganismos secretam ácidos orgânicos. A biodeterioração consiste na dissolução dos materiais pelos ácidos produzidos durante o metabolismo da microbiota local.

A produção de ácido sulfúrico, por bactérias do gênero *Thiobacillus*, é considerada a causa mais agressiva para biodeterioração do concreto<sup>(51, 56, 57, 58,59)</sup>. Para melhor compreender este fenômeno é importante conhecer o ciclo do enxofre e os microrganismos envolvidos neste processo .

### 2.1.3. O ciclo do enxofre associado ao processo de corrosão microbiológica e biodeterioração

Embora saiba-se que uma variedade grande de microrganismos, de gêneros e espécies diferentes, é encontrada nos processos de biodeterioração de materiais, os microrganismos que fazem parte do ciclo do enxofre têm um papel muito importante neste contexto. O ciclo em questão encontra-se esquematizado, simplificado, na Figura 1.

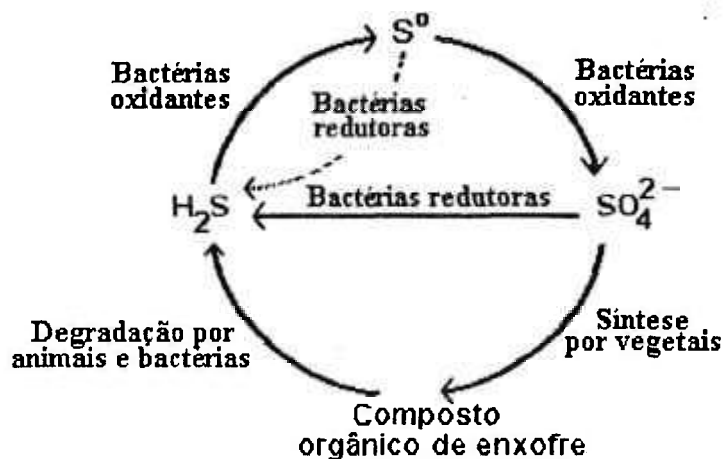


Figura. 1 : O ciclo do enxofre envolvendo as bactérias oxidantes aeróbias e bactérias redutoras anaeróbias.(VIDELA<sup>(87)</sup>)

#### 2.1.3.1. Bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (BRS), estritamente anaeróbias, compreendem os gêneros *Dessulfovibrio* (não esporuladas) e *Dessulfomaculum* (esporuladas). A temperatura ótima de crescimento está entre 25 e 44°C. Podem crescer em pH entre 5,5 e 9,0, sendo o pH ótimo de 7,2. São bactérias Gram negativas, curvas, sigmóides ou eventualmente espiraladas, com dimensões próximas a 0,5-1,0  $\mu m$  por 3,0-5,0  $\mu m$ , e movimentam-se por flagelo polar. No processo de respiração destas bactérias anaeróbias, o íon sulfato atua como aceptor final de elétrons em lugar do oxigênio <sup>(31)</sup>. A Figura 2 mostra o esquema do mecanismo de redução do sulfato por estas bactérias.

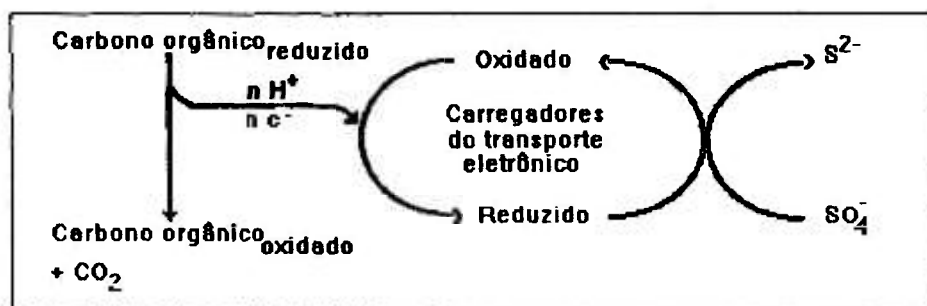


Figura 2 : Processo de respiração anaeróbia das bactérias redutoras de sulfato, onde o íon sulfato é o acceptor final de elétrons (GRAGNOLINO & TUOVINEN<sup>(31)</sup>)

### 2.1.3.2. Bactérias sulfoxidantes

Entre as bactérias aeróbias sulfoxidantes, envolvidas em processos de biodeterioração, encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Thiobacillus*, que compreendem bacilos gram-negativos, medindo aproximadamente 0,5 por 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$ . A energia para o seu metabolismo é obtida a partir da oxidação de um ou mais compostos reduzidos de enxofre, incluindo sulfetos, enxofre elementar, tiosulfato, politionatos e tiocianato. Os elétrons derivados do processo de oxidação entram na cadeia respiratória para formação de ATP<sup>(42)</sup>. O sulfato geralmente é o produto final, mas podem formar-se transitoriamente enxofre, sulfitos e politionatos<sup>(55, 58)</sup>. *T. ferrooxidans* é a única espécie do gênero capaz de obter energia por oxidação da pirita e do íon ferroso <sup>(31, 43, 88)</sup>.

Todas as espécies podem fixar o dióxido de carbono através do ciclo de Calvin e são, portanto, capazes de realizar o crescimento autotrófico; algumas espécies são quimiolitotróficas obrigatórias, enquanto outras são capazes de crescer também quimiorganotroficamente. A maioria das espécies movimentam-se mediante flagelo polar. A temperatura ótima de crescimento varia entre 20 e 43°C. O gênero inclui espécies aeróbias obrigatórias e anaeróbias facultativas denitrificantes. O pH ótimo de crescimento varia de 2 a 8. Em condições ótimas de laboratório a espécie *T. thiooxidans* cresce com enxofre elementar produzindo pH < 2 <sup>(43, 88)</sup>. Em contraste, algumas espécies de *T. thioparus* foram isoladas na Índia a partir de solos com pH=10<sup>(69)</sup>. A Figura 3 mostra esquematicamente a oxidação de um composto de enxofre reduzido por bactérias do gênero *Thiobacillus* em condições de aerobiose e anaerobiose.

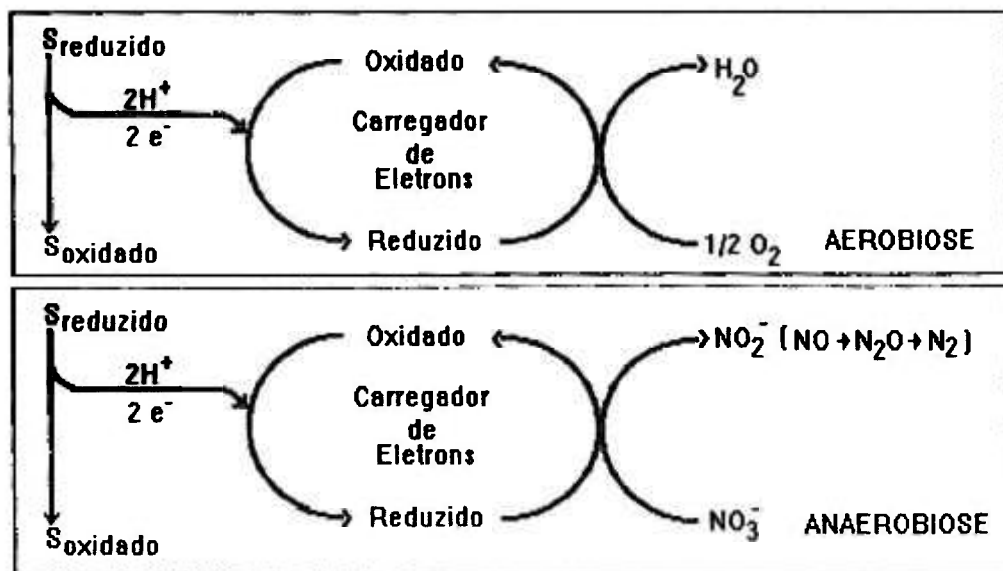


Figura 3 : Oxidação de compostos de enxofre por bactérias do gênero *Thiobacillus* em condições de aerobiose e anaerobiose (GRAGNOLINO & TUOVINEN<sup>(31)</sup>)

As reações apresentadas na Tabela 1 mostram que muitos compostos inorgânicos de enxofre são susceptíveis à oxidação microbológica. Nas vias metabólicas da oxidação biológica, ocorrem várias etapas mediadas por enzimas específicas, acopladas a um sistema transportador de elétrons, onde o oxigênio é reduzido a água como mostra a reação terminal:

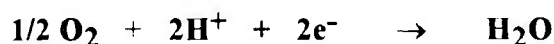


Tabela 1 : Reações de oxidação por *Thiobacillus* (GRAGNOLINO & TUOVINEN<sup>(31)</sup>)

$S_2O_3^{2-} + 2O_2 + H_2O$	$\rightarrow$	$2SO_4^{2-} + 2H^+$
$2S^0 + 3O_2 + 2H_2O$	$\rightarrow$	$2SO_4^{2-} + 4H^+$
$4S_2O_3^{2-} + O_2 + 2H_2O$	$\rightarrow$	$2S_4O_6^{2-} + 4OH^-$
$2S_4O_6^{2-} + 7O_2 + 6H_2O$	$\rightarrow$	$8SO_4^{2-} + 12H^+$
$2SCN^- + 4O_2 + 4H_2O$	$\rightarrow$	$2SO_4^{2-} + 2CO_2 + 2NH_4^+$
$H_2S + 2O_2$	$\rightarrow$	$SO_4^{2-} + 2H^+$
$2H_2S + O_2$	$\rightarrow$	$2S^0 + 2H_2O$
$2S_3O_6^{2-} + 4O_2 + 4H_2O$	$\rightarrow$	$6SO_4^{2-} + 8H^+$
$5H_2S + 8NO_3^-$	$\rightarrow$	$5SO_4^{2-} + 4N_2 + 4H_2O$
$5S^0 + 6NO_3^- + 2H_2O$	$\rightarrow$	$5SO_4^{2-} + 3N_2 + 4H^+$
$5S_2O_3^{2-} + 8NO_3^- + H_2O$	$\rightarrow$	$10SO_4^{2-} + 4N_2 + 2H^+$

A Figura 4 mostra as etapas envolvidas na oxidação do sulfeto, enxofre elementar e sulfoânions .

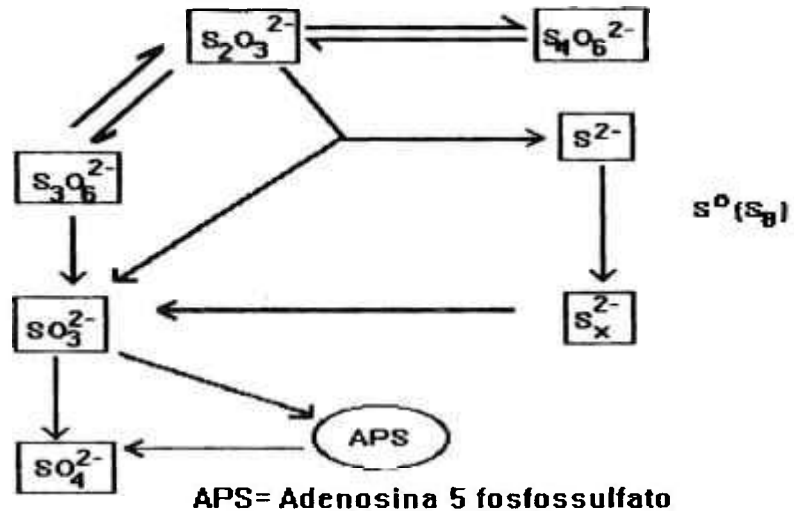


Figura 4 : Formas metaestáveis de enxofre decorrentes da oxidação de compostos inorgânicos de enxofre por bactérias do gênero *Thiobacillus* (GRAGNOLINO & TUOVINEN<sup>(31)</sup>)

O gênero *Thiobacillus* reúne microrganismos considerados os principais agentes etiológicos envolvidos nos processos de biodeterioração de concreto em esgotos (51, 56, 57, 58, 59, 71, 72). Segundo MILDE (51), a identificação de *Thiobacillus*, nos produtos de deterioração do concreto, é um fator importante para o estudo da biodeterioração do concreto influenciada pelo ambiente. No entanto, a identificação das espécies, para o gênero *Thiobacillus*, é, em alguns casos, relativamente complexa; por este motivo, algumas linhagens são classificadas em grupos (35). Desta forma, cada grupo reúne linhagens com o maior número de características similares entre si. A característica mais importante é o pH final que a linhagem a ser identificada consegue atingir em meio de cultura líquido. A Tabela 2, elaborada a partir dos dados da literatura (35, 43), apresenta o grupo, a espécie representante e algumas de suas características.

Tabela 2 : Características dos membros de cada grupo de *Thiobacillus*

Grupo	Espécie	pH final	Fonte de Carbono	Característica particular
0	*" <i>T. trautweinii</i> "	>6,6	autotrófico facultativo	flagelos peritríqueos
1a	** não há uma espécie definida	6,6-5,0	autotrófico facultativo	-
1	<i>T. novellus</i>	6,6 - 5,0	autotrófico facultativo	imóvel
2	<i>T. denitrificans</i>	6,6 - 5,0	autotrófico estrito	anaeróbia denitrificante
3	<i>T. thioparus</i>	5,0-3,5	autotrófico estrito	-
4	<i>T. neapolitanus</i>	5,0 - 2,8	autotrófico estrito	-
5	<i>T. thiooxidans</i>	<2,0	autotrófico estrito	resiste a pH<1,0
6	<i>T. ferrooxidans</i>	<2,0	autotrófico estrito	oxida Fe <sup>2+</sup>
7	<i>T. intermedius</i>	2,8-2,0	autotrófico facultativo	-

\* segundo a classificação de KELLY<sup>(43)</sup> as bactérias deste grupo encontram-se excluídas do gênero *Thiobacillus*

\*\* segundo KELLY<sup>(43)</sup> as bactérias do grupo 1a são provavelmente linhagens de *T. versutus*

A Figura 5 , elaborada por HUTCHINSON<sup>(35)</sup>, apresenta um diagrama onde os grupos do gênero *Thiobacillus* são separados em planos distintos. Os grupos são subdivididos, a princípio, em duas categorias quanto sua fonte de carbono: os autotróficos obrigatórios e os heterotróficos (autotróficos facultativos). A partir deste critério inicial, o pH final do meio de cultura passa a ser o divisor de grupos. Desta forma, tem-se autotróficas e heterotróficas cujo pH final do meio apresenta valor >5,0 e uma outra subdivisão cujo pH é <5,0. Entre os grupos que apresentam pH final do meio <5,0, tem-se os que apresentam pH final >2,8 e os que apresentam pH final <2,8. O centro da circunferência simboliza a linhagem que melhor representa cada grupo. Os fatores que definem a localização de uma determinada linhagem com relação espécie representante do grupo foram definidos detalhadamente em trabalho publicado por esse autor<sup>(35)</sup>.

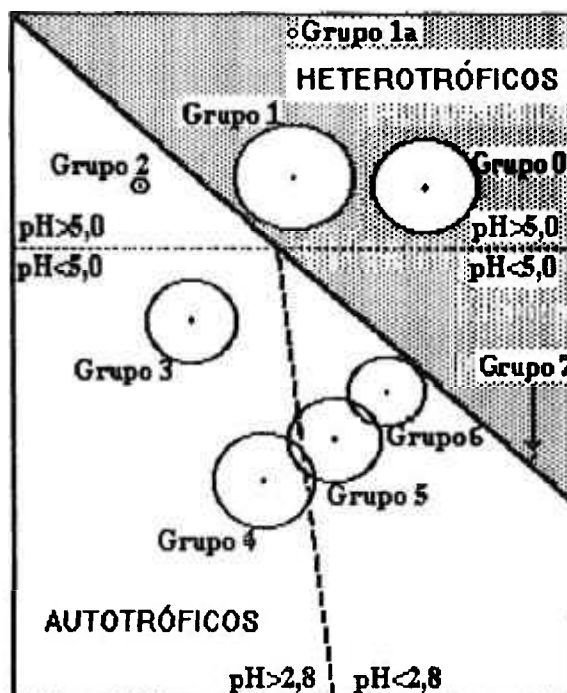


Figura 5 : Diagrama das relações entre os grupos de *Thiobacillus*, mostrando planos que separam os grupos conforme a fonte de carbono e o pH final no meio de cultura (HUTCHINSON<sup>(35)</sup>)

No Brasil, a indicação da ocorrência de bactérias sulfoxidantes, em amostras de solo do Estado de São Paulo, foi observada pela primeira vez em 1975, por LOPES<sup>(49)</sup>, onde todos os solos analisados apresentaram atividade oxidante do enxofre. Em 1983, PARON<sup>(60)</sup> observou que o número de *Thiobacillus* em sedimentos aquáticos da represa do Lobo, Brotas, Itirapira (S.P.), exercia influência na acidez da amostra analisada. Em 1991 SHIRAKAWA e colaboradores<sup>(78)</sup> isolaram *T.thiooxidans* e *T.ferrooxidans* do porto de areia de Itaquaquecetuba (S.P.). GARCIA Jr.<sup>(30)</sup> isolou *T.ferrooxidans* e *T. thiooxidans* a partir de amostras de efluentes de mina e minérios uraníferos contendo pirita procedentes de Poços de Caldas (MG), Figueira (PR), Siderópolis (S.C) e Lagoa Real (BA).

#### 2.1.4. Corrosão microbiológica de metais

A corrosão microbiológica de encanamentos subterrâneos, ocorrida nos Estados Unidos, em 1954, causou perdas estimadas entre 500 milhões e 2 bilhões de dólares anuais. No mesmo período, as perdas por este tipo de corrosão alcançaram no Japão 0,2 milhões de dólares<sup>(87)</sup>.

A denominação corrosão microbiológica, empregada para expressar a participação dos microrganismos nos fenômenos de corrosão, pode induzir a pensar-se na existência de um processo químico diferente, o que é um equívoco, pois a natureza eletroquímica da corrosão permanece válida nos casos de corrosão por microrganismos. Segundo VIDELA<sup>(87)</sup> os microrganismos participam do processo de corrosão da seguinte maneira:

- produzindo substâncias corrosivas, originadas no metabolismo, as quais podem ser de natureza química diversa, como álcalis, ácidos, sulfetos, etc, que transformam um meio originalmente inerte em agressivo;
- originando pilhas de aeração diferencial por efeito de um consumo desigual de oxigênio, como é o caso dos tubérculos encontrados na corrosão de canos de ferro ou em tanques de alumínio ou de suas ligas.

As reações de corrosão podem ser induzidas ou aumentadas por atividade microbiana, conforme as reações eletroquímicas clássicas de corrosão, resultando na dissolução do metal dos sítios anódicos e captação subsequente de elétrons nos sítios catódicos. O consumo de elétrons varia dependendo do potencial de oxi-redução da superfície. Em ambientes aeróbios o oxigênio é oceptor de elétrons, formando óxidos e hidróxidos do metal. Quando o ambiente apresenta potencial de oxi-redução baixo, os prótons tornam-se aceptores de elétrons, produzindo gases e outros produtos altamente reduzidos<sup>(28)</sup>. Segundo FORD<sup>(28)</sup>, os microrganismos envolvidos no processo de corrosão estão classificados em quatro grupos distintos:

- bactérias redutoras de sulfato;
- bactérias "formadoras de limo";
- bactérias oxidadoras de ferro; e
- grupo variado, contendo bactérias sulfoxidantes, fungos e algas.

#### 2.1.4.1. Processo aeróbio de corrosão microbiológica

As informações a respeito da influência dos microrganismos sobre o mecanismo de corrosão aeróbia são limitadas porque o processo oxidativo abiótico é muito mais rápido. A maior influência aparente de uma comunidade aeróbia sobre a superfície do metal é a criação

de uma célula de aeração diferencial. A formação de uma comunidade heterogênea de microrganismos produz um filme microbiano sobre a superfície do metal, que resulta na depleção de oxigênio sob o filme. Nestas condições, uma área de depleção de oxigênio torna-se anódica em relação a outra área mais oxigenada. No ânodo o metal susceptível sofre oxidação e vai para a solução, enquanto os elétrons liberados combinam-se com a água e o oxigênio no cátodo<sup>(28, 87)</sup>. A Figura 6 apresenta este processo de forma esquemática .

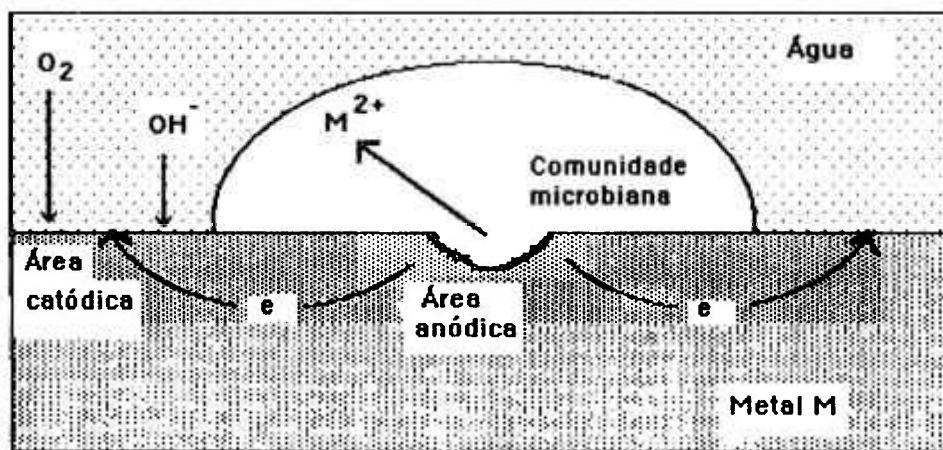


Figura 6 : Célula de aeração diferencial composta por uma comunidade microbiana aeróbia sobre a superfície de um metal (ATLAS<sup>(11)</sup>)

#### 2.1.4.2. Processo anaeróbio de corrosão microbiológica

A corrosão de metais em ambientes anaeróbios tem sido amplamente estudada. Os microrganismos de maior importância neste processo são as bactérias redutoras de sulfato<sup>(54)</sup>. Os produtos de corrosão na presença destas bactérias são o sulfeto de ferro e o hidróxido de ferro II.

As bactérias redutoras de sulfato são identificadas como os microrganismos mais comumente responsáveis pelo processo de corrosão sob condições anaeróbias. Acredita-se que elas podem influenciar o processo diretamente, pelo consumo de hidrogênio catódico (despolarização catódica), ou indiretamente por produção de sulfeto como produto final de seu metabolismo. Um dos mecanismos de corrosão anaeróbia na presença das BRS, apresentado por PANKHANIA<sup>(54)</sup> é ilustrado na Figura 7 .

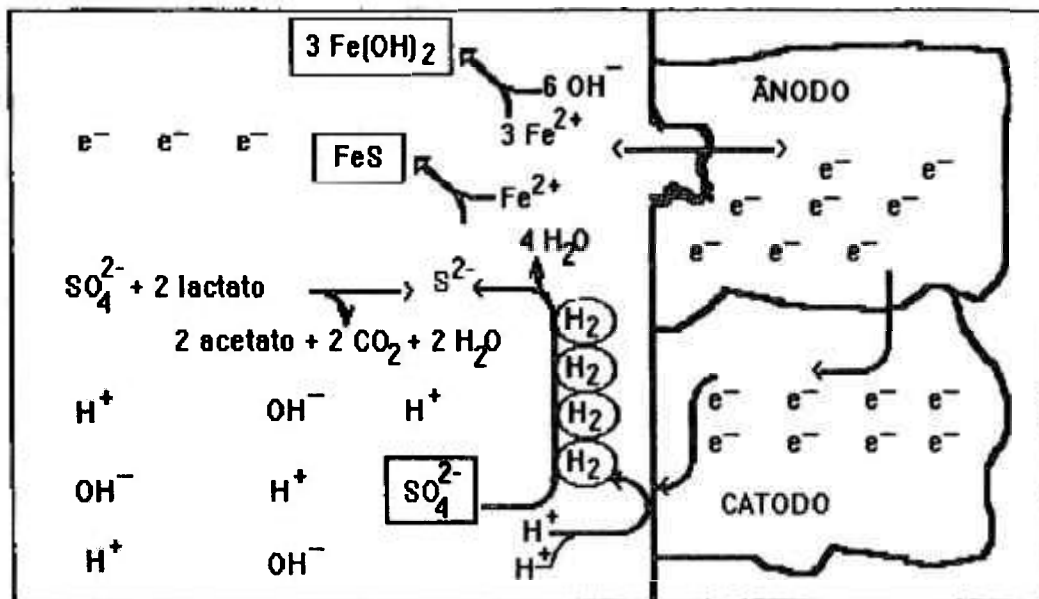
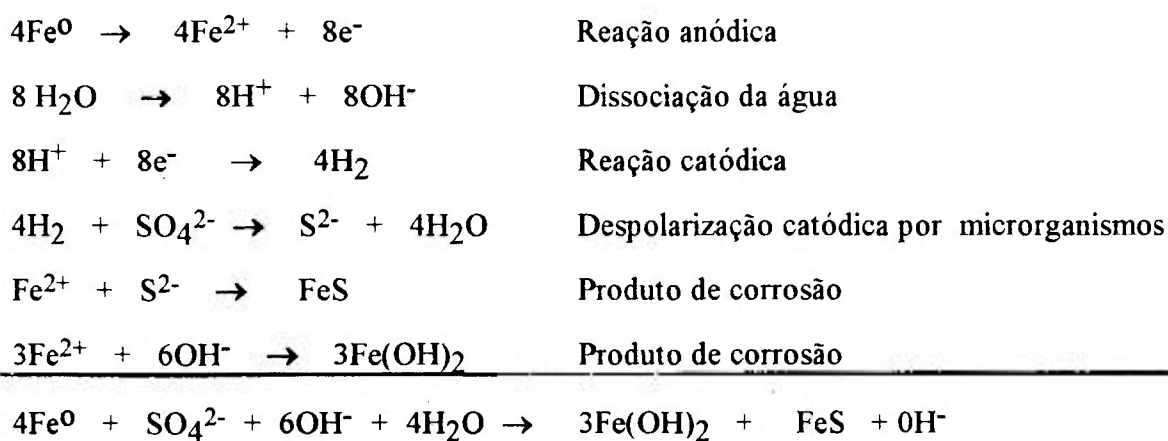


Figura 7 : Mecanismo de corrosão anaeróbia por bactérias redutoras de sulfato (PANKHANIA<sup>(54)</sup>)

As reações descritas a seguir sumarizam o mecanismo que descreve a corrosão anaeróbia do ferro:



### **2.1.5. A ecologia da corrosão microbiológica**

O estudo da interação microbiana no processo de corrosão microbiológica é tema central de uma revisão publicada por FORD & MITCHELL<sup>(28)</sup>, do Laboratório de Ecologia de Microrganismos da Universidade de Harvard, onde os autores discutem alguns conceitos ecológicos ligados a corrosão microbiana, dos quais destacam-se:

- O papel da microbiota de superfície;
- A interação exopolímero-metal; e
- O papel da associação de microrganismos.

Nesta revisão, os autores separaram os processos envolvidos na corrosão microbiológica em seções sub-itemizadas a seguir para facilitar a discussão. No entanto, é importante lembrar que todos os processos podem estar ocorrendo simultaneamente na superfície de uma mesma comunidade.

#### **2.1.5.1. O papel da microbiota de superfície**

Para compreender a função dos microrganismos no processo de corrosão, é essencial obter-se informações sobre a complexidade da ecologia das comunidades microbianas, capazes de crescer e aderir a superfície de sólidos.

Nenhum substrato metálico parece ser totalmente imune a colonização por microrganismos, embora a velocidade de colonização possa ser fortemente afetada por íons tóxicos (cobre e níquel) ou inclusões de biocidas. A natureza do biofilme é tal que o glicocalix, material extracelular que os microrganismos secretam, geralmente formado por polissacarídeos, podem ter ação quelante ligando-se a íons tóxicos e biocidas, tornando-os ineficazes.

#### **2.1.5.2. Interação exopolímero-metal**

Os polímeros extracelulares, produzidos por bactérias, são comumente ácidos e contêm grupos funcionais que reagem prontamente com íons metálicos. Alguns estudos estabeleceram que existem diferenças consideráveis entre a capacidade ligante de um íon metálico particular e um exopolímero específico. A extensão da ligação depende de fatores

ambientais, tais como pH, potencial de oxi-redução, e competição de íons. A ligação do metal com o exopolímero microbiano depende da estrutura química do exopolímero.

### 2.1.5.3. O papel da associação de microrganismos

A complexidade da interação microbiana no ambiente não pode ser realisticamente modelada em laboratório; por esta razão, a velocidade de corrosão medida em laboratório é invariavelmente bem menor do que aquela encontrada no meio ambiente. Uma das razões primárias é a associação de microrganismos presentes na superfície do biofilme. O estudo da associação é dificultado em virtude da inabilidade de isolar-se populações específicas de comunidades sinérgicas.

As bactérias redutoras de sulfato associam-se freqüentemente a outros microrganismos anaeróbios, sendo os seus produtos metabólicos utilizados como substrato por outros membros da associação. A associação de microrganismos parece ter um papel importante no processo de corrosão anaeróbia. Formam-se nichos nos quais ocorre a transferência interespecífica de hidrogênio e utilização de ácidos graxos por bactérias redutoras de sulfato. Desenvolvem-se interações complexas similares entre populações de microrganismos aeróbios na superfície do metal. Recentemente, PANKHANIA <sup>(54)</sup> sugeriu que as bactérias sulfoxidantes estão presentes dentro de comunidades microbianas anaeróbias. A aeração pode tornar estas bactérias ativas, produzindo metabólitos ácidos e aumentando as reações de corrosão.

## **2.2. Biodeterioração do concreto**

O levantamento bibliográfico, sobre o fenômeno de biodeterioração do concreto, por questões didáticas foi dividida em três sub-ítem:

- a biodeterioração da matriz do cimento hidratado;
- a corrosão das armaduras para concreto armado; e
- a biodeterioração do concreto em repositórios finais para rejeitos radioativos.

Entende-se por concreto a mistura íntima resultante da homogeneização proporcionada de um cimento Portland e suas adições, agregados miúdos e agregados graúdos com a água. A matriz inclui sempre o cimento hidratado e o agregado miúdo. O termo biodeterioração do concreto é uma forma genérica de mencionar a biodeterioração da matriz. Entende-se por concreto armado aquele onde são colocadas armaduras (barras e fios de aço) para absorver os esforços de tração e compressão.

### **2.2.1. Biodeterioração da matriz de cimento hidratado**

#### **2.2.1.1. A carbonatação da matriz de cimento hidratado:**

O concreto é uma mistura de cimento, agregado miúdo (geralmente areia quartzosa), agregado graúdo (geralmente granito) e água. Os constituintes quimicamente ativos são o cimento e a água. Quando estes compostos reagem, formam-se os compostos hidratados do cimento, responsáveis pelas propriedades mecânicas do concreto. Os agregados podem ser considerados como materiais inertes. Durante a hidratação ocorre a liberação de hidróxido de cálcio, o que torna a solução no poro do concreto altamente alcalina (pH 11-12,5). Neste estágio acreditava-se que o concreto deveria estar livre do ataque por microrganismos. Com a exposição da superfície do concreto ao gás carbônico atmosférico ocorre a carbonatação da superfície exposta até que todo o hidróxido de cálcio superficial seja convertido em carbonato de cálcio (uma solução saturada de carbonato de cálcio tem um pH de 10,2). Na presença de umidade, parte do carbonato de cálcio é dissolvido como bicarbonato que, em contato com o CO<sub>2</sub> atmosférico e água (formando por sua vez o ácido carbônico) atinge um estado de equilíbrio. Uma solução de bicarbonato nestas condições tem um pH 8,4. O concreto exposto a esta atmosfera torna-se quimicamente estável nesta condição (57).

### 2.2.1.2. Ação ácida na matriz de cimento hidratado

As soluções ácidas causam a dissolução progressiva da portlandita  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  e de silicatos e aluminatos hidratados da matriz. Quando os ácidos formam sais solúveis em água, com o hidróxido de cálcio do concreto, estes sais são arrastados pela água

Entre os ácidos produzidos biologicamente encontram-se ácidos fracos, como os ácidos orgânicos de modo geral, e os ácidos fortes como os ácidos nítrico e sulfúrico. O ácido sulfúrico é mais agressivo ao concreto porque além do fenômeno de dissolução da matriz, seu sal correspondente, o sulfato, pode reagir com os compostos hidratados do cimento formando compostos expansivos como a etringita  $(3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{CaSO}_4 \cdot 31\text{H}_2\text{O})$ , taumasita  $(\text{CaSiO}_3 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 15\text{H}_2\text{O})$  e a gipsita  $(\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ . Vale ressaltar que o fenômeno de dissolução é rápida e a reação com o sulfato é lenta<sup>(12)</sup>.

### 2.2.1.3. Histórico sobre a biodeterioração do concreto

O primeiro caso de biodeterioração do concreto foi observado na cidade de Melbourne, Austrália, em 1945, por PARKER<sup>(56)</sup>. A superfície interna do concreto da rede de esgoto desta cidade apresentava-se deteriorado apenas acima do nível das águas servidas; na atmosfera deste esgoto detectou-se uma quantidade apreciável de gás sulfídrico. Nas regiões deterioradas foi observada a presença de sulfato de cálcio, ácido sulfúrico livre e enxofre elementar. Por não ser explicada a produção de ácido sulfúrico livre a partir de gás sulfídrico, sem a contribuição biológica, este autor investigou a presença de *Thiobacillus* nos produtos de deterioração deste concreto. Foram isoladas cinco linhagens de bactérias produtoras de ácido sulfúrico. Por suas características morfológicas de cultura em meio de cultura sólido e propriedades bioquímicas das linhagens, PARKER<sup>(56)</sup> identificou-as como pertencentes a uma nova espécie denominando-as de *Thiobacillus concretivorus*. Atualmente estas linhagens estão recatalogadas como *Thiobacillus thiooxidans*<sup>(43)</sup>.

No mesmo ano, PARKER<sup>(57)</sup> publicou um trabalho evidenciando a deterioração do concreto por essas mesmas linhagens isoladas, expondo amostras de argamassa em atmosfera contendo gás sulfídrico, em condições laboratoriais controladas. A argamassa foi acidificada até atingir  $\text{pH} = 5,0$  para posterior inoculação. A deterioração ácida típica ocorreu apenas nas amostras inoculadas com os *Thiobacillus* isolados.

O processo de deterioração do concreto do esgoto de Melbourne foi analisado por RIGDON<sup>(66)</sup> como uma sequência de etapas :

- Produção de gás sulfídrico no esgoto por bactérias redutoras de sulfato e decomposição de proteínas;
- Escape do gás sulfídrico do esgoto para a atmosfera;
- Oxidação do gás sulfídrico pelos *Thiobacillus* com formação de ácido sulfúrico ( em laboratório o gás sulfídrico não é consumido diretamente, parte do gás sulfídrico é transformado abioticamente para enxofre elementar e este é oxidado pelos *Thiobacillus*);
- Decomposição da pasta de cimento endurecida, por ação do ácido sulfúrico.

Para facilitar a visualização deste processo elaborou-se a Figura 8 que ilustra esquematicamente as etapas citadas no processo de biodeterioração do concreto de esgoto de Melbourne.

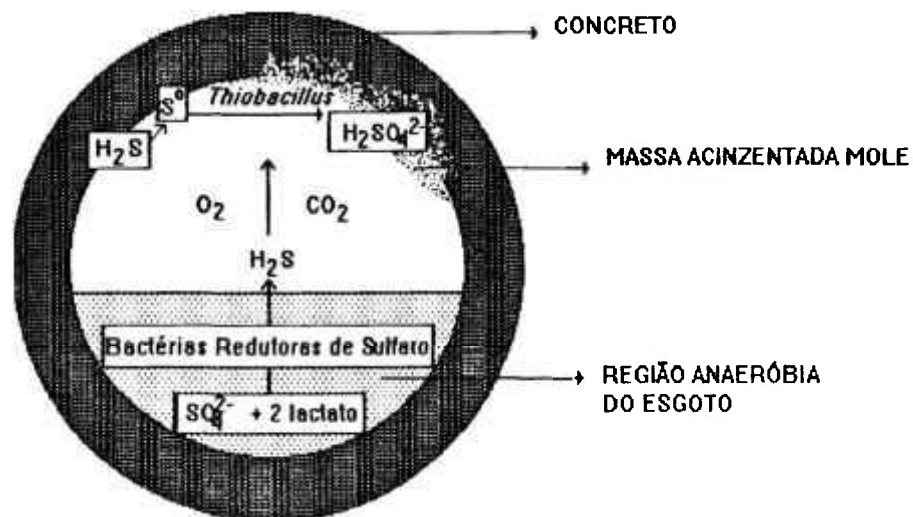


Figura 8: Seção transversal da tubulação de concreto apresentando biodeterioração

Este tipo de deterioração foi observado predominantemente em climas quentes, porém, em 1977, tornou-se um problema sério no concreto da rede de esgoto de Hamburgo, Alemanha. Nesta cidade, as canalizações de concreto recém-construídas foram deterioradas até uma profundidade de 4 cm, por ataque de ácido sulfúrico. No prazo de dez anos, vários quilômetros destes concretos necessitaram de restauração (51, 71). Este problema parece ter sido causado pelo teor elevado de compostos de enxofre dos detergentes e um aumento no conteúdo de proteínas nas águas servidas do esgoto, os quais conduziram a uma maior produção de compostos voláteis de enxofre, resultantes da degradação dos aminoácidos. Em

poucos anos, concretos novos, do esgoto, deterioraram-se apesar de serem cobertos por uma camada protetora de epoxi.

MILDE e colaboradores<sup>(51)</sup> efetuaram um estudo para identificar quais as espécies de *Thiobacillus* que poderiam estar presentes neste concreto, e qual o envolvimento destas bactérias na biodeterioração do concreto. Os resultados do estudo ecológico realizado por estes autores evidenciaram um desenvolvimento sucessivo de espécies diferentes de *Thiobacillus* durante o processo de biodeterioração do concreto.

Os resultados encontrados por MILDE<sup>(51)</sup> são parcialmente coincidentes com os encontrados por PARKER & PRIST<sup>(58)</sup> e PARKER<sup>(59)</sup>, obtidos do concreto do esgoto de Melbourne; onde foram isolados *T.thiooxidans*, *T.neapolitanus* e organismos que convertem tiosulfato em tetracionato, resultando num aumento do pH do meio de cultura ("linhagem M", "*T.trauweinii*"). No esgoto de Hamburgo não foram encontradas as espécies *T. denitrificans*, *T. thioparus* e "linhagem M", as quais foram encontrados em número relativamente elevado no esgoto de Melbourne. As diferenças na distribuição das espécies dos *Thiobacillus* encontrados parecem ser dependentes do meio ambiente.

TAYLOR & HUTCHINSON<sup>(83)</sup> registraram um problema sério de deterioração do concreto, em torres de refrigeração, associado à atividade de bactérias sulfoxidantes presentes em número elevado na água de circulação e nos produtos úmidos deteriorados. Outro caso de deterioração do concreto, não relacionado ao esgoto, foi relatado por THORNTON<sup>(84)</sup> em túneis de concreto dos lagos artificiais de Piedmont e Clendening também envolvendo a ocorrência de *Thiobacillus*.

O problema da biodeterioração do concreto no esgoto de Hamburgo despertou o interesse de pesquisadores que modernizaram as técnicas para detectar a presença de *Thiobacillus* produtores de ácido, em amostras ambientais, através da investigação de um ácido graxo específico empregado como um biomarcador<sup>(44, 45)</sup>.

#### 2.2.1.4. Biodeterioração acelerada do concreto em condições laboratoriais controladas

Em experimentos laboratoriais com condições extremamente controladas, SAND e colaboradores<sup>(71)</sup> reproduziram a biodeterioração do concreto em câmaras contendo gás sulfídrico e amostras de concreto inoculadas com diversas espécies dos *Thiobacillus* isolados de Hamburgo. Neste experimento as amostras compostas por cimento Portland de alto forno apresentaram alteração do pH da superfície do concreto de 9 para 2, em um

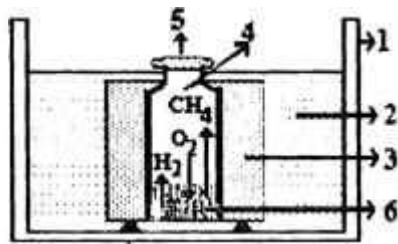
período de 50 dias, enquanto as amostras compostas por cimento Portland comum levaram 120 dias para apresentar essa mesma alteração no pH. Em trabalho publicado posteriormente. SAND & BOCK<sup>(72)</sup> constataram, depois de 270 dias de incubação das amostras de concreto em câmara controlada de H<sub>2</sub>S, que os corpos de prova de concreto confeccionados com cimento Portland de alta resistência a sulfatos apresentaram deterioração negligenciável; os corpos confeccionados com cimento Portland comum apresentaram grau médio de deterioração, enquanto que os corpos confeccionados com cimento Portland de alto-forno exibiram forte grau de deterioração.

#### 2.2.1.5. Atividade vital dos microrganismos no interior do concreto

A alcalinidade elevada do concreto e os efeitos inibidores do íon hidroxila sobre a atividade vital das células, tornam duvidoso o desenvolvimento dos microrganismos no interior do concreto. No entanto, esta hipótese apresenta-se questionada por DROZD<sup>(26)</sup> que comprovou o desenvolvimento de microrganismos nos poros do concreto, cuja água apresentava pH na faixa de 11,5 a 12,5. Nos poros artificialmente criados foram encontradas bactérias amonificantes aeróbias e anaeróbias, bactérias denitrificantes, bactérias do silicato, leveduras e fungos.

Esta questão, referente à atividade vital de microrganismos nesta faixa de pH, no interior do concreto, é motivo de polêmica e desperta o interesse para várias situações na engenharia civil; por esta razão, o experimento efetuado por DROZD<sup>(26)</sup> é descrito, neste item, de forma mais detalhada.

A Figura 9 ilustra o modelo experimental elaborado pelo autor para a detecção da atividade vital dos microrganismos nos poros artificialmente construídos. Os tubos capilares de vidro representam uma célula juntamente com três filmes de teflon, onde se efetuou o estudo microbiológico. A cavidade de vidro continha ar, e a água não penetrou dentro desta cavidade, mas saturou os poros da base do corpo de prova de concreto e manteve-se acumulada por forças de capilaridade.



- 1) Tanque de aerção
- 2) Solução com lodo
- 3) Corpo de prova de concreto
- 4) Cavidade de vidro sem fundo
- 5) Tampa de borracha
- 6) Zona de capilares de vidro incorporados ao concreto para observação da atividade vital dos microrganismos

Figura. 9 : Corpo-de-prova de concreto com cavidade artificial e zona de capilares de vidro incorporados para observação da atividade vital de microrganismos(DROZD<sup>(26)</sup>)

A população de microrganismos da água no tanque de aerção foi representada por comunidades de várias bactérias, incluindo o gênero *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, e também fungos, algas e protozoários. Depois de 1, 3, 6 e 12 meses o autor investigou a presença de microrganismos nos corpos-de-prova de concreto, tanto nas células de tubos capilares quanto na massa do concreto. Os resultados deste trabalho indicaram que o número de microrganismos aumentou com o tempo. A pesquisa abrangeu corpos-de-prova confeccionados com vários tipos de cimento, sendo que, de todos eles foram isolados microrganismos. O acúmulo de metano, na atmosfera do vidro, determinado por cromatografia, confirmou a atividade vital dos microrganismos nos poros do concreto.

A Figura 10 ilustra a mudança na composição de gases na cavidade artificial encontrada pelo autor.

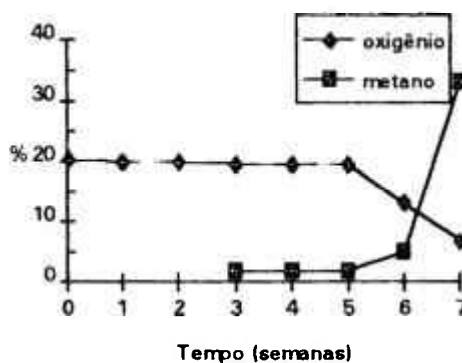


Figura. 10 : Mudança da composição de gases na atmosfera dentro da cavidade de vidro do corpo-de-prova de concreto(DROZD<sup>(26)</sup>)

A detecção de espécies aeróbias e anaeróbias, e a sua proliferação, nos poros do concreto, indicaram um estado ativo da microbiota nas condições extremas de pH no interior do poro. O autor supõe que, as células microbianas, ao entrarem nos poros do concreto, durante a infiltração e difusão da água, do tanque para a base do corpo-de-prova, adaptam-se às condições de pH do poro (igual a 12). Neste caso, ocorre a interação de dois princípios: a alcalinidade do concreto age sobre os microrganismos, e, por outro lado, os microrganismos mudam o valor do pH do meio para as suas próprias condições ótimas através da produção de ácido durante o seu metabolismo.

A adaptação das células microbianas para as condições existentes nos poros é acompanhada pela seleção de microrganismos, e conduz à formação de uma biocenose estável em condições extremas. Neste caso, a interrelação na comunidade de microrganismos é metabiótica. A falta de oxigênio nos poros do concreto favorece o crescimento de espécies anaeróbias. A nutrição é provida pela massa trocada entre o ambiente externo e a água do poro. A massa de troca ocorre em virtude de dois contra-fluxos de difusão: as substâncias oxidadas difundem-se de fora para dentro e, as reduzidas, de dentro para fora.. Dessa forma, os microrganismos mantêm sua atividade vital nos espaços porosos. A sobrevivência dos mesmos para estas condições de alcalinidade elevada parece ser dependente de vários fatores:

- a habilidade de criar condições favoráveis em zonas localizadas;
- formação de comunidades com interrelações metabióticas;
- o consumo de compostos orgânicos que se difundem como nutriente; e
- a propriedade do concreto de reagir com o dióxido de carbono, em evolução, liberado como produto final do metabolismo, carbonatando a parede do poro, com conseqüente diminuição do pH na água do poro.

#### 2.2.1.6. Biodeterioração do concreto por diferentes espécies de *Thiobacillus*

Os resultados da análise microbiológica, encontrados no concreto do esgoto de Hamburgo<sup>(51)</sup>, permitem concluir que no início do processo de biodeterioração predominam as bactérias quimiolitotróficas facultativas, neste caso, predominando *T. intermedius* e *T. novellus*, que são capazes de crescer em ambientes neutros ou ligeiramente alcalinos. À medida que a deterioração prossegue e o valor do pH na superfície do concreto cai para menos de 6,0 o número de *T. neapolitanus* aumenta. Se o pH da superfície cai para abaixo

de 5,0, os *T. thiooxidans* iniciam o seu crescimento causando acidificação intensa, abaixando para pH 2 a superfície do concreto . A Figura 11 esquematiza o processo em questão. Esta figura foi elaborada a partir dos resultados apresentados por MILDE<sup>(51)</sup>

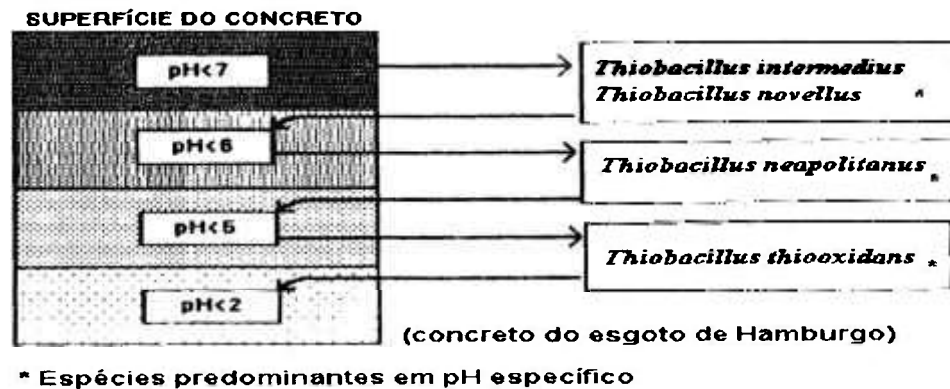


Figura 11 : Biodeterioração do concreto apresentando seqüência do desenvolvimento sucessivo de espécies neutrofilicas e acidofilicas de *Thiobacillus*.

#### 2.2.1.7. Mecanismo de biodeterioração do concreto por microrganismos de vários gêneros e espécies

Em trabalho publicado por KARAVAIKO<sup>(41)</sup>, foram encontradas bactérias heterotróficas no concreto íntegro e em amostras com diferentes graus de deterioração. Evidenciou-se que estas bactérias utilizavam os lignosulfonatos, empregados como aditivos do concreto.

Este autor propõe um mecanismo de ação da biodeterioração do concreto, onde as bactérias heterotróficas estariam iniciando o processo; medida que se formam substâncias orgânicas simples, com diminuição do pH, e, com consumo de oxigênio em micro-regiões, inicia-se o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato, que produzem gás sulfídrico, o qual é oxidado em condições aeróbias pelo *T. thioparus* até sulfato. O autor acredita que este processo esteja relacionado com o aumento do teor de sulfato encontrado no extrato aquoso do concreto analisado. Nas zonas parcialmente deterioradas aparecem as bactérias nitrificantes, a sua quantidade aumenta significativamente no concreto deteriorado. Neste caso não ocorreu o desenvolvimento dos microrganismos acidofilicos.

Entre as bactérias quimiolitotróficas encontradas estão as bactérias tiônicas e as bactérias nitrificantes; entre os microrganismos heterototróficos, encontraram-se as bactérias amônicas, bactérias denitrificantes e fungos filamentosos. As bactérias fotossintéticas são

representadas por *Synetococcus sp.* Neste processo tomam parte bactérias aeróbias e anaeróbias, e algumas destas encontram-se em associações tróficas.

Para ilustrar melhor o mecanismo de biodeterioração do concreto proposto por este autor elaborou-se a Figura 12 que ilustra o processo de biodeterioração do concreto por desenvolvimento sucessivo de bactérias de gêneros e espécies diferentes.

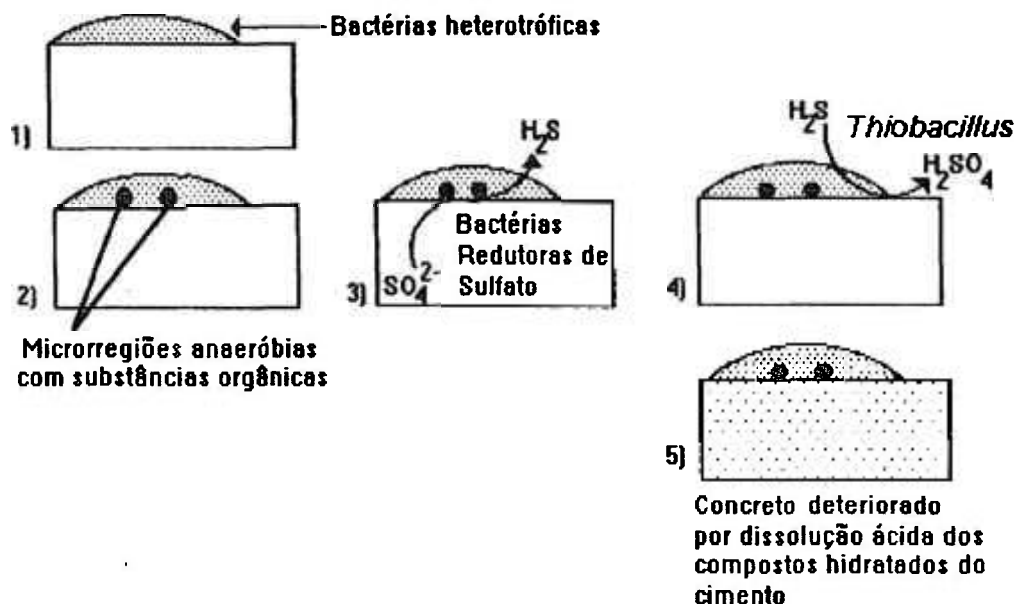


Fig.12 : Mecanismo de biodeterioração do concreto envolvendo um processo sequencial de colonização por bactérias de gêneros e espécies diferentes.

#### 2.2.1.8. Presença de microrganismos em concretos brasileiros.

O primeiro indício da presença de microrganismos em concretos brasileiros foi observado por RIBAS SILVA <sup>(65)</sup>, que encontrou vários tipos de microrganismos ao analisar a microestrutura de concretos coletados em Brasília. No entanto, nestes casos, não foram efetuadas análises microbiológicas nestes concretos, portanto não é possível saber se os microrganismos estavam vivos, participando do processo de deterioração, ou se estes eram contaminações provenientes dos agregados, e embora presentes, estavam inviáveis no interior do concreto.

Em 1992, SHIRAKAWA e colaboradores<sup>(79)</sup> encontraram bactérias heterotróficas, fungos e indicação para *Thiobacillus* e bactérias redutoras de sulfato em concreto deteriorado na cidade de São Paulo.

### 2.2.1.9. Estudo de biocidas no combate à biodeterioração

Por razões econômicas, o interesse na prevenção do processo de biodeterioração tem aumentado nos últimos anos. Uma possibilidade para reduzir a extensão da deterioração pode ser a inibição do crescimento dos *Thiobacillus* pela aplicação de biocidas. EMMEL e colaboradores<sup>(27)</sup> testaram 16 biocidas quanto capacidade de inibição do crescimento de *Thiobacillus* e obtiveram resultados satisfatórios em dois tipos de biocidas, o que permite sugerir-se que estes podem ser utilizados com sucesso para prevenir ou reduzir a biodeterioração do concreto por produção biológica de ácido sulfúrico. Este trabalho não revela a composição química destes biocidas.

Algumas substâncias químicas são mencionadas por BORZANI<sup>(13)</sup> como inibidoras de bactérias de modo geral, entre elas estão os compostos quaternários de amônio, policlorofenóis, poliaminas, diclorodi-hidroxifenilmetano, brometo de dimetilcetilamônio, tri-*n*-butilborato e etilidenodiacetato.

### 2.2.2. Corrosão microbiológica em armaduras para concreto armado

Os trabalhos publicados sobre a corrosão microbiológica em armaduras são raros. Neste item é discutido um trabalho publicado por MOOSAVI<sup>(52)</sup> onde o autor evidencia a ação das bactérias redutoras de sulfato na corrosão em armaduras para concreto armado.

A corrosão de metais, em particular de materiais ferrosos, por bactérias redutoras de sulfato é um fenômeno bem documentado<sup>(54, 87)</sup> No entanto, a corrosão de armaduras de aço em concreto armado, como resultado direto da atividade das bactérias redutoras de sulfato é pouco estudado. A corrosão do aço das armaduras pode resultar em expansão e deterioração da estrutura do concreto.

A água presente no poro do concreto, em torno da armadura, tem um pH de aproximadamente 12,5, e é mantido neste valor pela camada rica em hidróxido de cálcio em contato íntimo com a superfície da armadura. Enquanto este pH é mantido, esta região está passiva, e a armadura deve permanecer livre de corrosão. O ingresso de íons agressivos como o cloreto, próximo à armadura, pode alterar uma região da armadura do estado passivo para um estado ativo.

Segundo MOOSAVI<sup>(52)</sup>, dois tipos de bactérias podem estar implicadas na corrosão da armadura no concreto: as bactérias aeróbias sulfoxidantes e as bactérias anaeróbias redutoras de sulfato. O papel das bactérias sulfoxidantes não está restrito somente a sistemas de esgoto, pois algumas publicações indicaram a sua presença em tanques de estocagem de

óleo, construídos em concreto e abastecidos de aeração suficiente. A ação das BRS na corrosão da armadura do concreto não está bem definida. Supõe-se que o gás sulfídrico produzido pelas BRS pode ser utilizado como substrato pelas bactérias sulfoxidantes no processo de oxidação. Outra possibilidade é o sulfeto, produzido biologicamente, reagir com a superfície do aço da armadura causando a corrosão. Em tanques de estocagem de óleo, onde coexistem condições aeróbias e anaeróbias, tanto as BRS, quanto as bactérias sulfoxidantes podem estar ativas completando o ciclo do enxofre.

Os resultados publicados por MOOSAVI<sup>(52)</sup> propõem um mecanismo de corrosão da armadura de aço do concreto por bactérias redutoras de sulfato: o sulfeto biologicamente produzido pela atividade destas bactérias, pode permear através do concreto, formando uma camada de sulfeto de ferro sobre a armadura; sob tensão, esta camada se rompe, dando continuidade ao processo de corrosão; na sequência, espera-se uma corrosão por pite. O sulfeto de ferro, formado sobre a armadura, por ser volumoso, pode causar expansão e fissuramento do concreto que cobre a armadura.

Quanto metodologia utilizada, MOOSAVI<sup>(52)</sup> conclui que as técnicas de impedância de corrente alternada e ruído eletroquímico, mostraram-se valiosas na monitoração da corrosão microbiológica de armaduras do concreto.

### **2.2.3. Biodeterioração do concreto por microrganismos em repositórios finais para rejeitos radioativos**

A deposição de rejeitos radioativos em repositórios finais de superfície ao nível do solo é uma prática bem aceita, adotada pela Agência Internacional de Energia Atômica (International Atomic Energy Agency). Somente rejeitos com nível médio ou baixo de radiação, contendo radionuclídeos com meia vida curta podem ser depositados neste tipo de repositório<sup>(37, 40)</sup>. Os concretos utilizados como barreiras de engenharia em repositórios de superfície ao nível do solo, devem manter a durabilidade por 300<sup>(67, 93)</sup> a 500 anos<sup>(14, 64)</sup>.

Quando a escala de tempo envolve algumas centenas de anos, alguns fatores pouco relevantes para a construção civil passam a ser considerados. Visando esta questão, algumas instituições de pesquisa ligadas energia nuclear, em vários países que adotaram a deposição ao nível do solo, estão preocupadas com o processo de biodeterioração do concreto em repositórios finais para rejeitos radioativos e a interrelação com a biotransformação dos rejeitos nele depositados<sup>(16, 32, 50, 63, 70)</sup>.

A NIREX (Nuclear Industry Radioactive Waste Executive), uma empresa prestadora de serviços de gerenciamento de rejeitos radioativos na Inglaterra, desenvolveu um programa amplo de pesquisa para determinar a influência dos microrganismos nos locais de deposição de rejeitos radioativos. O estudo observou como populações mistas de microrganismos podem sobreviver e crescer em um repositório de concreto para rejeitos radioativos de nível baixo de radiação. Esta pesquisa confirmou que existem microrganismos capazes de crescer sobre os componentes orgânicos dos rejeitos, em pH elevado, próximo ao concreto do repositório. O pH de 12,25 parece ser o limite superior tolerável para o crescimento microbiano. Embora os rejeitos não se apresentem como substratos ótimos para a atividade vital microbiana, as condições ambientais são suficientes para permitir o crescimento dos microrganismos<sup>(32)</sup>.

Esse estudo feito pela NIREX indicou também que tanto o dióxido de carbono quanto o metano podem ser formados, por ação microbiana, dentro do repositório. O dióxido de carbono pode ter sua concentração limitada por reagir com o concreto. A fração celulósica é a principal determinante do crescimento celular e do aparecimento de compostos orgânicos solúveis.

Acredita-se que compostos intermediários sejam produzidos no rejeito até que ocorra o crescimento do próximo microrganismo, necessário para a continuidade da biotransformação sequencial. Os compostos solúveis nos poros do concreto e a população de microrganismos presentes no rejeito irão variar com o tempo e sustentar a atividade biológica por um período prolongado. As estimativas do modelo matemático adotado por HODGKINSON & COOPER<sup>(32)</sup>, sugeriram que a maior ação microbiana dentro do repositório será atingida depois de 400 anos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Equipamentos**

- Autoclave, marca Lutz Ferrando, modelo Esteril-matic vapor Lufenco, São Paulo, Brasil;
- Autoclave, marca Phoenix, modelo AV-18, Araraquara, São Paulo;
- Balança analítica com precisão de 0,001mg, marca Mettler, Zurique, Suíça;
- Balança semi-analítica com precisão de 0,1 g, marca Mettler, modelo Pn 1210, Zurique, Suíça;
- Banho-maria, marca Quimis, Diadema, Brasil;
- Contador de colônia, marca Gallenkamp, catálogo No CX 300, Inglaterra;
- Destilador de água, marca Corning, modelo AG11, São Paulo, Brasil;
- Estufa para esterilização e secagem, marca Lutz Ferrando, São Paulo, Brasil;
- Fluxo laminar, marca Veco, modelo VLFS 18, Campinas, Brasil;
- Incubadora bacteriológica, marca Precision PS Scientific, modelo 805, Estados Unidos da América;
- Incubadora bacteriológica construída no IPEN;
- Potenciômetro marca Digimep, modelo DMpH2, São Paulo, Brasil;
- Refrigerador marca Brastemp, 320 litros, Brasil;
- Shaker, (agitador de erlenmeyers), marca New Brunswick Scientific, modelo Incubator Shaker- serie 25, New Jersey, USA..

##### **3.1.2. Materiais**

- Balões volumétricos: de borossilicato (Pyrex ou vidro neutro) com capacidade de 100 mL, 1 L e 2 L;
- Bico de Bunsen;
- Estantes de arame galvanizado, perfuradas, para tubos de ensaio com 18 mm de diâmetro X 180mm comprimento e para tubos com 16mm de diâmetro X 150mm de comprimento;
- 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. Este frasco deve ter capacidade para volumes maiores do que 100 mL para permitir boa homogeneização;

- Frascos de Erlenmeyer, de borossilicato com capacidade de 250 mL, 500 mL, 1000 mL e 2000 mL;
- Jarras de anaerobiose;
- Membrana filtrante, marca Millipore de porosidade 0,22 micrômetro;
- Pipetas, tipo Mohr de 5 e 10 mL com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão;
- Placas de Petri, de vidro pyrex ou plástico atóxico transparente;
- Porta filtro para membrana filtrante;
- Sistema gerador de dióxido de carbono e hidrogênio;
- Tela de amianto;
- Tripé;
- Tubos de ensaio: de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, de 18mm x 180mm e 16mm x 150mm;

### 3.1.3. Reagentes

Acetato de chumbo p.a., Merck;  
 Ácido bórico p.a., CAAL;  
 Ácido sulfúrico p.a., Q.M.;  
 Agar; Merck  
 Agarose , Sigma: Type II Medium EEO/A-6877  
 Bicarbonato de sódio p.a., CAAL;  
 Cloreto de amônio p.a., Merck;  
 Cloreto de cálcio p.a., CAAL;  
 Cloreto de cobalto hexahidratado p.a., Merck;  
 Cloreto de magnésio hexahidratado p.a.; CAAL;  
 Cloreto de manganês tetra hidratado p.a., Carlo Erba;  
 Cloreto de potássio p.a.; CAAL;  
 Cristal violeta p.a., Nuclear;  
 Dextrose p.a., Merck;  
 Enxofre elementar p.a., Ecibra;  
 Extrato de levedura; Difco;  
 Fosfato de potássio dibásico p.a.; Nuclear;  
 Fosfato de potássio monobásico p.a., Nuclear;  
 Hidróxido de sódio p.a., Merck;  
 Iodeto de potássio p.a., Merck;

Iodo p.a., Reagen;  
Lactato de sódio p.a., Merck;  
Molibidato de amônio p.a., Carlo Erba;  
Nitrato de cálcio P.A, CAAL;  
Neopeptona; Difco  
Nitrato de potássio p.a., Nuclear ;  
Oxalato de amônio p.a.,Merck;  
Safranina p.a., Fluka;  
Sulfato de amônio p.a., Ecibra;  
Sulfato de cobre heptahidratado p.a.,Merck;  
Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado p.a., Merck;  
Sulfato ferroso heptahidratado p.a., Nuclear;  
Sulfato de magnésio heptahidratado p.a.; Nuclear;  
Sulfato de zinco heptahidratado p.a.; Q.M. ;  
Tiocianato de amônio p.a., Merck;  
Tiosulfato de sódio pentahidratado p.a., Merck;  
Triptona, Difco;  
Verde de bromocresol p.a., Merck;  
Vermelho de fenol p.a.,Merck.

#### **3.1.4. Soluções**

As soluções utilizadas e o modo de preparo estão listadas no Anexo I

#### **3.1.5. Meios de cultura**

A Tabela 3 apresenta os meios de cultura utilizados e sua aplicação neste trabalho. A fórmula e modo de preparo destes meios podem ser encontrados no Anexo II.

Tabela 3 : Meios de cultura e sua utilização

Meio de cultura	Utilização
Postgate líquido modificado para <i>T.thioparus</i>	Teste presuntivo para <i>T.thioparus</i>
Postgate sólido modificado para <i>T.thioparus</i>	Isolamento de <i>T.thioparus</i>
ATCC 238 líquido adaptado para <i>T.thioparus</i> (0,5% de tiosulfato de sódio)	Crescimento de <i>T.thioparus</i>
Postgate líquido modificado para <i>T.thiooxidans</i>	Teste presuntivo para <i>T. thiooxidans</i>
Postgate sólido modificado para <i>T.thiooxidans</i>	Isolamento de <i>T. thiooxidans</i>
9K - S <sup>0</sup> líquido	Enriquecimento de <i>T.thiooxidans</i>
9K - Fe <sup>2+</sup> líquido	Teste presuntivo para <i>T.ferrooxidans</i>
"TK" sólido	Isolamento de <i>T.ferrooxidans</i>
ATCC 238 com 1% de S <sup>0</sup> (pH = 4,2)	Crescimento de <i>T.thiooxidans</i>
ATCC 238 com 1% de S <sup>0</sup> (pH = 12)	Sobrevivência de <i>T.thiooxidans</i>
ATCC 238 - tiosulfato agar	Isolamento de <i>T.thiooxidans</i>
Meio de cultura para indicação de espécie anaeróbia ( <i>T.denitrificans</i> )	Teste presuntivo para <i>T.denitrificans</i>
Agar triptona extrato de levedura	Contagem de bacterias heterotróficas
Agar Sabourand dextrose	Contagem de fungos
Meio de Starkey	Teste presuntivo para Bactéria redutoras de sulfato
Meio S6	Teste de identificação (cepa neutrofilica)
Meio S5	Teste de identificação (cepas acidofilicas)
SO + 6% de tiosulfato	Teste de identificação (cepa neutrofilica)
S6 + 4% de fosfato	Teste de identificação (cepa neutrofilica)
S5 + 4% de fosfato	Teste de identificação (cepas acidofilicas)
S6 + 1% de S <sup>0</sup> (sem tiosulfato)	Teste de identificação (cepa neutrofilica)
S5 + 1% de S <sup>0</sup> ( sem tiosulfato)	Teste de identificação (cepas acidofilicas)
S6 + 5% de NaCl	Teste de identificação (cepa neutrofilica)
S5 + 5% de NaCl	Teste de identificação (cepas acidofilicas)
S8	Teste de identificação para observar denitrificação em anaerobiose
S7	Teste de identificação para observar crescimento em tiocianato
Agar nutriente	Teste de identificação para observar crescimento heterotrófico
Agar citrato de Simon's	Teste de identificação para observar utilização de citrato

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Descrição geral dos experimentos efetuados**

Neste trabalho foram realizadas análises microbiológicas quantitativas envolvendo testes presuntivos para obtenção do número mais provável de *Thiobacillus*, contagem de bactérias heterotróficas e fungos em estudo-de-caso. Também foram efetuados testes presuntivos qualitativos para bactérias redutoras de sulfato. As determinações da massa seca das amostras analisadas, o pH e umidade foram realizados como ensaios complementares análise microbiológica. A composição química e reconstituição de traço caracterizaram o concreto analisado em estudo-de-caso.

Amostras de areia e do ambiente construído foram analisadas com testes presuntivos qualitativos para *Thiobacillus*.

A partir dos testes presuntivos positivos para *Thiobacillus* efetuaram-se o isolamento e purificação de cepas com características neutrofilicas e acidofilicas.

As culturas puras isoladas foram submetidas a um conjunto de testes preliminares para identificação de *Thiobacillus*.

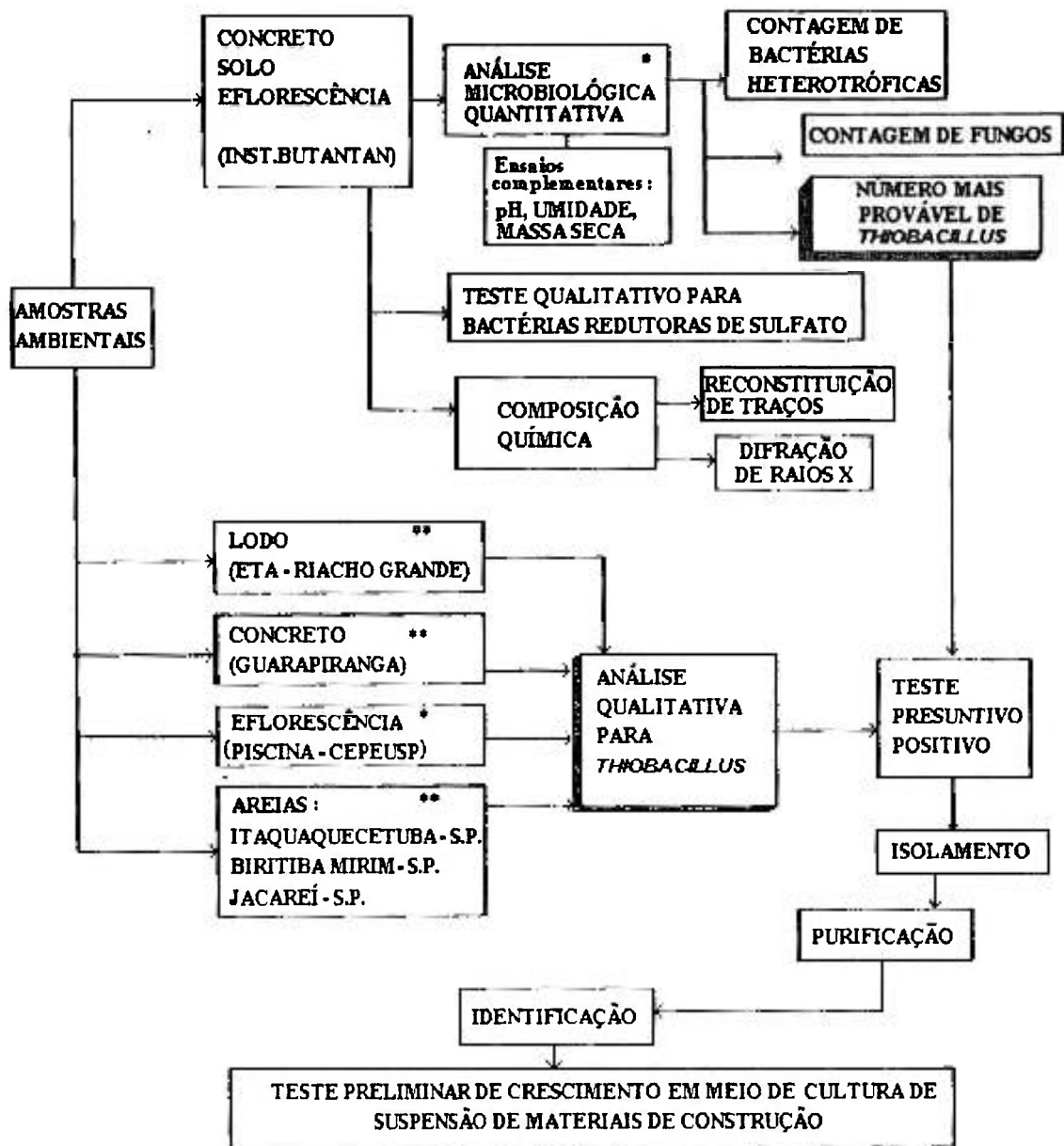
Posteriormente, foram realizados testes qualitativos de crescimento de cepas puras em meios de cultura elaborados com suspensões de materiais de construção.

A Figura 13 apresenta um esquema geral dos experimentos efetuados.

### **3.2.2. Amostras estudadas**

A análise microbiológica quantitativa foi efetuada em estudo-de-caso de um reservatório de água, apresentando deterioração evidente em várias regiões da estrutura de concreto.

Para a análise qualitativa, foram estudadas amostras do ambiente construído, de diferentes naturezas, coletadas em localidades distintas. Estudaram-se também amostras de areias destinadas construção civil.



\* Ensaios efetuados com suspensão aquosa da amostra (1:10)

\*\* Ensaios efetuados com inoculação direta da amostra

Figura 13 : Esquema geral apresentando a procedência das amostras analisadas e as etapas dos experimentos efetuados

### 3.2.2.1. Concreto do reservatório de água do Instituto Butantan

O estudo-de-caso, no qual se realizou o teste dos tubos múltiplos para obtenção do número mais provável de *Thiobacillus*, contagem de bactérias heterotróficas e fungos, foi efetuado sobre o concreto de um reservatório de água construído na década de 1970. Este reservatório está situado próximo à Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, e pertence ao Instituto Butantan - São Paulo. O aspecto geral da estrutura de concreto pode ser observado na Figura 14 .



Figura 14: Estrutura geral do reservatório de água do Instituto Butantan, São Paulo

Várias regiões do concreto deste reservatório de água apresentavam danos agrupados conforme características distintas:

- Fissuras na junta de concretagem, com vazamento de água e acúmulo de eflorescência constituída de carbonatos.
- Expansão do concreto na região da armadura corroída.
- Corrosão da armadura em região com vazamento e lixiviação de produto ferruginoso.

Foram coletadas amostras de eflorescência, abaixo da junta de concretagem, amostra do concreto com corrosão da armadura e amostra de solo em contato com a base da estrutura do concreto. As características das amostras coletadas estão apresentadas na Tabela 4 .

Tabela 4 : Características das amostras coletadas, para análise microbiológica, da estrutura de concreto do reservatório de água do Instituto Butantan

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Característica da amostra</b>	<b>Aspecto macroscópico</b>
<b>Eflorescência (calcita)</b>	<b>C.1</b>	Região apresentando eflorescência por vazamento de água	Úmida, porosa, com colonização aparente por microrganismos, coloração amarelada e esverdeada
<b>Concreto com corrosão da armadura</b>	<b>C.2</b>	Concreto deteriorado com corrosão da armadura exposta	Concreto expandido, seco, quebradiço, colonização aparente por fungos, coloração verde-escuro
<b>Solo em contato com o concreto</b>	<b>C.3</b>	Solo em contato com a base da estrutura de concreto deteriorado	Solo aparentemente seco com acúmulo de eflorescência proveniente da lixiviação da bases da estrutura de concreto

Uma das regiões com fissura na junta de concretagem é apresentada na Figura 15 Abaixo da fissura ocorre a formação de uma camada de eflorescência, onde ocorre vazamento de água. A Figura 16 mostra um detalhe da região apresentando eflorescência.

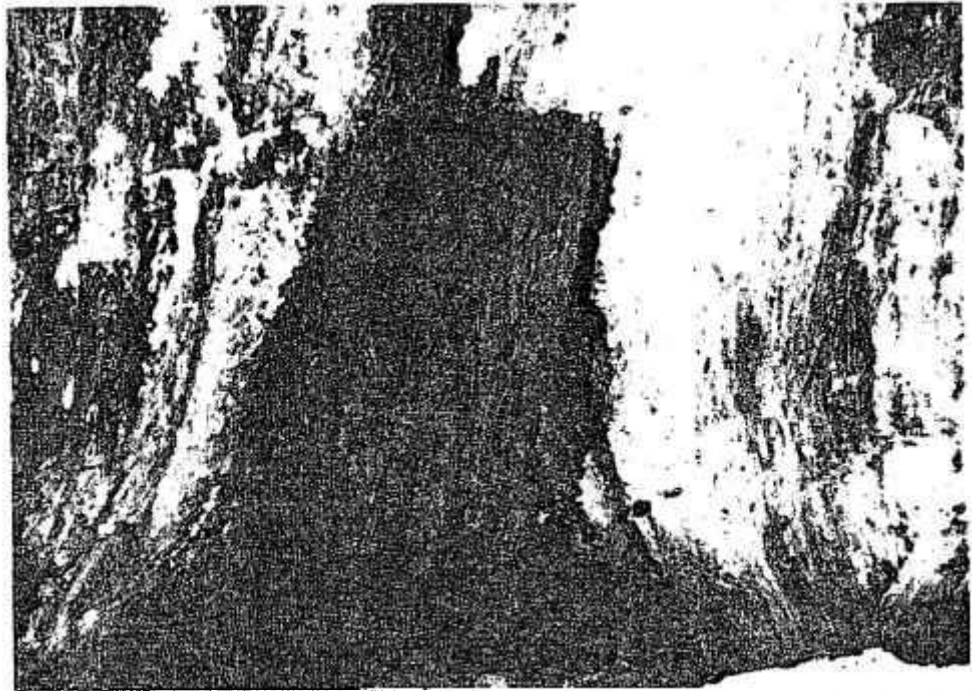


Figura 15 : Fissura na junta de concretagem, abaixo da qual ocorre vazamento de água com formação de eflorescência por evaporação da água de lixiviação- reservatório de água do Instituto Butantan, São Paulo.

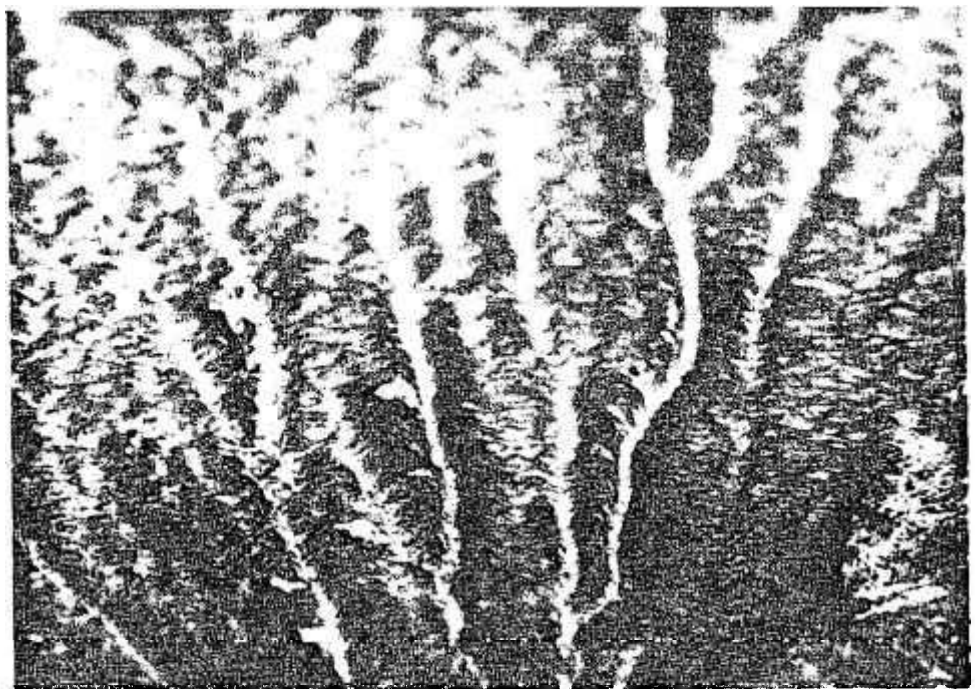


Figura. 16 : Detalhe da região do concreto apresentando eflorescência - reservatório de água do Instituto Butantan, São Paulo

A Figura 17 evidencia, em detalhe, uma região onde ocorre fissura. A faixa esbranquiçada, acima da fissura, mostra acúmulo de eflorescência sem umidade aparente. A faixa esverdeada, abaixo da fissura, apresenta-se com vazamento de água, onde a eflorescência possui uma consistência gelatinosa e aspecto arenoso; causando a impressão da ocorrência de colonização por microrganismos

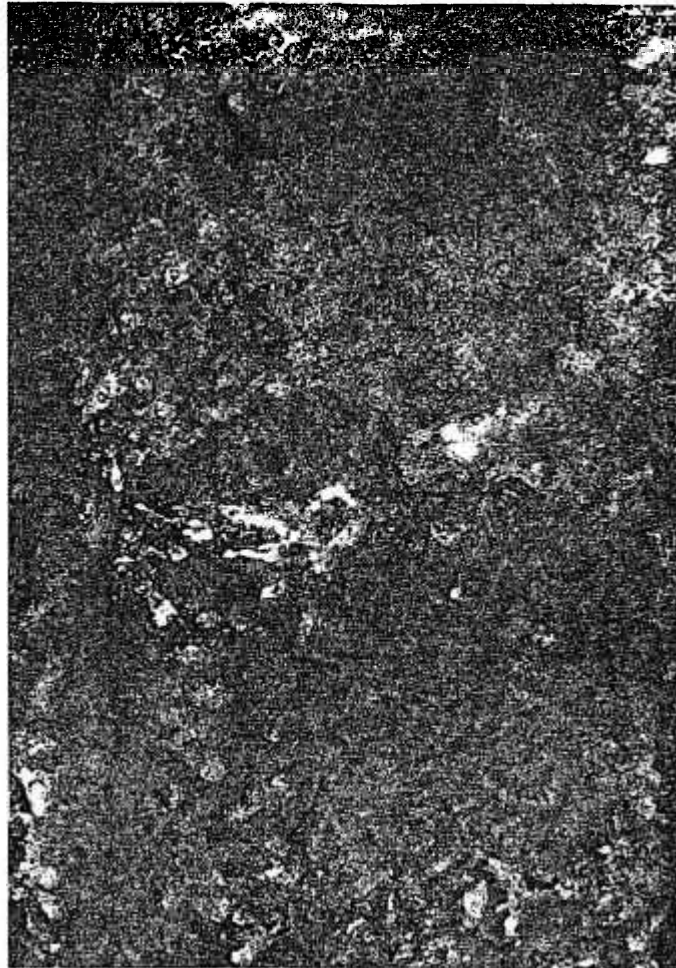


Figura. 17 : Detalhe de uma região da fissura na junta de concretagem - reservatório de água do Instituto Butantan, São Paulo

As Figuras 18 e 19 mostram, respectivamente, uma região do concreto com corrosão da armadura e a base do concreto em contato com o solo



Figura 18 : Detalhe da região apresentando concreto com corrosão da armadura exposta- reservatório de água do Intituto Butantan, São Paulo



Figura 19 : Base do reservatório assentado diretamente sobre o solo- reservatório de água do Intituto Butantan, São Paulo

### 3.2.2.2. Amostras coletadas do ambiente construído

Para a realização de testes qualitativos presuntivos, que indiquem presença de *Thiobacillus* no ambiente construído, coletou-se amostras relacionadas com o concreto, de natureza diversa, em localidades distintas. Foram coletadas amostras de lodo em contato com o concreto, eflorescência, concreto e cano de ferro apresentando corrosão evidente. As amostras coletadas, com sua procedência e características macroscópicas são apresentadas na Tabela 5 .

Tabela 5 : Características das amostras coletadas do ambiente construído de localidades distintas

Amostra	Código	Características	Procedência
Lodo em contato com viga de ferro com corrosão evidente	C.4	Coloração ocre-alaranjado, consistência gelatinosa	ETA do Riacho Grande (São Bernardo do Campo- S-P)
Lodo em contato com o concreto em deterioração	C.5	Semelhante à amostra anterior	ETA do Riacho Grande (São Bernardo do Campo- S-P)
Lodo de fundo do decantador	C.6	Semelhante à amostra anterior, coletada do fundo do decantador	ETA do Riacho Grande (São Bernardo do Campo- S-P)
Brita graúda com concreto	C.7	Amostra parcialmente recoberta por limbo escuro	Captador de água bruta da represa de Guarapiranga (São Paulo - S.P.)
Concreto	C.8	Semelhante à anterior	Captador de água bruta da represa de Guarapiranga (São Paulo - S.P.)
Raspado do concreto	C.9	Semelhante à anterior	Captador de água bruta da represa de Guarapiranga (São Paulo - S.P.)
Estalactite por eflorescência no concreto	C.10	Incrustação calcárea na forma de estalactites da parede de concreto de uma piscina olímpica	Piscina do CEPEUSP Cidade Universitária (São Paulo - S.P.)
Cano de ferro	C.11	Amostra com corrosão severa recoberta por eflorescência da lixiviação do concreto	Piscina do CEPEUSP Cidade Universitária (São Paulo - S.P.)

ETA= Estação de tratamento de água

CEPEUSP= Conjunto de práticas esportivas da Universidade de São Paulo.

### 3.2.2.3. Amostras de areias para construção civil

Areias de diferentes procedências foram coletadas para o teste presuntivo qualitativo para *Thiobacillus*. A procedência e as características das amostras estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 : Características das amostras de areias procedentes de Biritiba Mirim, Jacarei e Itaquaquecetuba

Amostra	Código	Característica	Procedência
Areia bruta	A.1	Areia antes da lavagem, coletada de uma região interna do monte (no Setor de areias do IPT)	Biritiba Mirim - S.P.
Areia bruta	A.2	Areia antes da lavagem, coletada de uma região externa do monte (Setor de areias do IPT)	Biritiba Mirim - S.P.
Areia lavada	A.3	Areia lavada, ainda molhada, coletada em contato com o chão de concreto (Setor de areias do IPT)	Biritiba Mirim - S.P.
Areia lavada	A.4	Areia lavada, ainda molhada, coletada de uma região superior do monte (Setor de Areias do IPT)	Biritiba Mirim - S.P.
Areia lavada	A.5	Areia lavada, seca, coletada após secagem de uma região superior do monte, (Setor de areias do IPT)	Biritiba Mirim - S.P.
Areia úmida	A.6	Areia com umidade de chuva coletada na região superior do monte (depósito a céu aberto no IPEN)	Jacarei - S.P.
Areia molhada	A.7	Areia com umidade de chuva, coletada do interior do monte (de depósito a céu aberto no IPEN)	Jacarei - S.P.
Areia Molhada	A.8	Areia encharcada com água de chuva, em contato com o solo, (depósito a céu aberto no IPEN)	Jacarei - S.P.
Areia do Porto	A.9	Areia final do porto, coletada de um monte pronto para distribuição do porto de areia de Itaquaquecetuba	Itaquaquecetuba - S.P.
Arenito	A.10	Arenito cimentado por sulfetos, coletado de uma região rica em pirita do porto de areia de Itaquaquecetuba	Itaquaquecetuba - S.P.

O objetivo de investigar a presença de *Thiobacillus* nas areias é observar se estas, enquanto materiais de construção, permitem a proliferação destas bactérias. É importante considerar que as amostras procedentes de Biritiba Mirim foram coletadas no Setor de areias

do IPT e as amostras de Jacareí foram coletadas em depósito no IPEN, enquanto as amostras de Itaquaquecetuba foram coletadas diretamente do porto.

### **3.2.3. Coleta e preservação das amostras:**

#### **3.2.3.1. Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas cuidadosamente com espátulas e recipientes, previamente esterilizados em autoclave a vapor, à temperatura de 121°C, durante 15 minutos, tendo-se o cuidado de utilizar uma espátula para cada amostra diferente.

#### **3.2.3.2. Preservação das amostras**

As amostras foram inoculadas, nos respectivos meios de cultura, no mesmo dia da coleta. A única amostra de areia não processada no mesmo dia, foi mantida em geladeira por um período de cinco dias; neste caso, efetuou-se teste qualitativo para *Thiobacillus*.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Análise microbiológica realizada em estudo-de-caso**

A análise microbiológica foi realizada em estudo-de-caso, na qual quantificou-se, por teste presuntivo, alguns tipos de microorganismos. Este estudo foi efetuado no concreto aparente do reservatório de água do Instituto Butantan, S.P. Foram coletadas amostras de concreto com corrosão da armadura, eflorescência e solo em contato com a base da estrutura de concreto, conforme descrito na Tabela 4. Para obter-se informações sobre a microbiota deste concreto, determinou-se o número mais provável (NMP) de *Thiobacillus*, a contagem de bactérias heterotróficas e fungos. Realizou-se também um teste qualitativo para bactérias redutoras de sulfato.

### 3.3.1.1. Técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP) de *Thiobacillus*

O número mais provável (NMP) de *Thiobacillus* foi determinado pela técnica dos tubos múltiplos. Esta técnica foi aplicada conforme a Norma Técnica CETESB L5.217/1991<sup>(21)</sup>.

Para a determinação do NMP de *T.thioparus* utilizou-se o meio de Postgate modificado para *T.thioparus*; para determinação do NMP de *T.thiooxidans*, o meio de Postgate modificado para *T. thiooxidans* e para a determinação do NMP de *T.ferrooxidans*, o meio 9K modificado para *T.ferrooxidans*.

Na tentativa de investigar a presença de cepas anaeróbias de *Thiobacillus* utilizou-se o meio de Postgate modificado para *T.thioparus*, adicionando-se a este 2 g /L de nitrato de potássio, 1 g/L de bicarbonato de sódio e uma gota de ácido sulfúrico 0,5 molar para cada 10 mL de meio de cultura. Esta adaptação foi efetuada com base no meio utilizado por TAYLOR e colaboradores <sup>(82)</sup>.

Somente as amostras inoculadas para investigação de *Thiobacillus* anaeróbios foram incubadas em anaerobiose, as demais foram incubadas em aerobiose.

A Tabela 7 ilustra a reação principal que ocorre em cada meio de cultura, como consequência do metabolismo da bactéria a ser selecionada neste meio seletivo, que resulta em uma mudança visual observável, através da qual constata-se a indicação do crescimento de uma determinada espécie de *Thiobacillus*. As reações completas, com o balanço estequiométrico, encontram-se na Tabela 1 .

**Tabela 7 : Meios de cultura utilizados para determinação do NMP de *Thiobacillus***

Meio de cultura	Espécie de <i>Thiobacillus</i>	Reação	Indicação de crescimento
Postgate modificado com vermelho de fenol	<i>T.thioparus</i>	$S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2SO_4^{2-}$	Viragem do indicador vermelho → amarelo
Postgate modificado com verde de bromocresol	<i>T.thioxidans</i>	$S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2SO_4^{2-}$	Viragem do indicador verde → amarelo
Meio 9K com $FeSO_4$	<i>T.ferrooxidans</i>	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$	Oxidação do $Fe^{2+}$ Verde → laranja
Meio de Postgate modificado com $KNO_3$ e $NaHCO_3^-$	<i>T.denitrificans</i>	$S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2SO_4^{2-}$	viragem do indicador vermelho → amarelo

#### Fundamento da técnica:

Esta técnica baseia-se 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. A diluição sucessiva da amostra leva ao ponto de extinção, ou seja, atinge-se uma determinada diluição a partir da qual não há mais bactérias. O NMP obtido pela técnica dos tubos múltiplos é resultante de uma análise estatística baseada na distribuição de Poisson (11)

Neste caso, utilizaram-se cinco tubos para cada diluição, sendo que cada tubo é marcado simplesmente como positivo ou negativo, não sendo necessário pesquisar o número de microrganismos em cada tubo positivo. A combinação de resultados positivos e negativos da etapa de diluição, antes da extinção, é utilizada em conexão com tabelas estatísticas apropriadas (como por exemplo a Tabela 8 ) para obter a contagem de bactérias viáveis.

A Tabela 8 apresenta os índices de NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1mL e 0,1 mL em séries de cinco tubos.

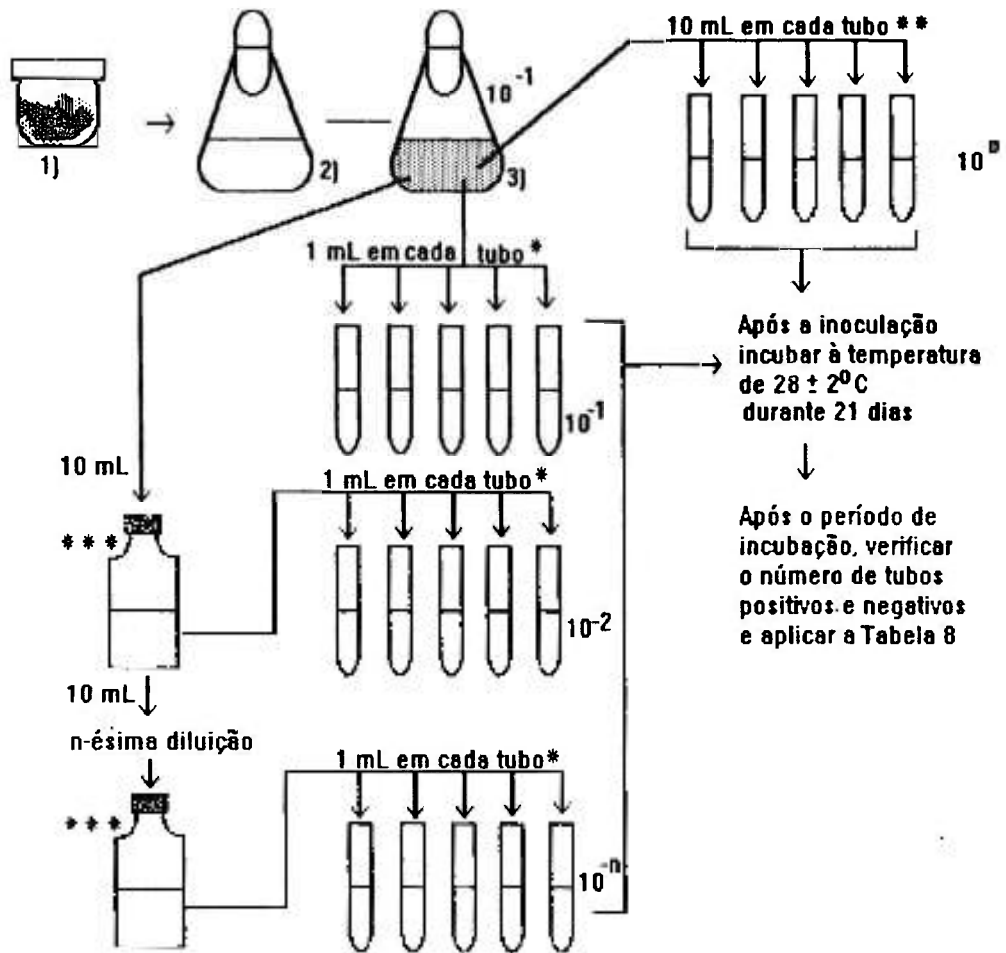
### **Procedimento da técnica**

Por tratar-se de amostras sólidas e semi-sólidas, efetuou-se inicialmente uma suspensão de cada amostra em água destilada estéril em uma proporção 1:10 (massa de amostra : volume de água).

A suspensão foi homogeneizada e submetida a uma agitação de 200 rpm durante 30 min. Um mililitro desta suspensão corresponde a 0,1g da amostra.

Para a inoculação nos meios de concentração dupla, foram utilizados 10 mL desta suspensão, enquanto que para os meios de concentração simples utilizaram-se 1mL e submúltiplos de 1mL. (inoculando-se 1 mL das diluições sucessivas efetuadas a partir desta suspensão, utilizando-se o fator 10 de diluição)

A Figura 20 apresenta um esquema geral de procedimento para a execução da técnica dos tubos múltiplos. Os detalhes operacionais para o procedimento desta técnica podem ser encontrados na referência 21.



- 1) Amostra
- 2) Água destilada estéril
- 3) Suspensão 1:10 da amostra em água destilada estéril após agitação de 200 rpm por 30 min.

\* Tubo contendo 10 mL (concentração simples) de meio líquido de cultura seletivo para cada espécie

\*\* Tubo contendo 10 mL (concentração dupla) de meio líquido de cultura seletivo para cada espécie

\*\*\* Frasco contendo 90 mL de água de diluição

Figura 20 : Esquema geral para o procedimento da técnica dos tubos múltiplos.

Tabela 8 : Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são utilizados inóculos de 10 mL, 1mL e 0,1 mL em séries de cinco tubos<sup>(21)</sup>

Número de tubos com reação positiva quando são inoculados , em séries de cincotubos, Inóculos de			Índice de NMP/100mL	Limites de confiança de 95%	
10 mL	1mL	0,1mL		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	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	-	-

### Interpretação dos resultados:

O NMP foi obtido através de tabelas, em que são dados os limites de confiança de 95 % para cada valor determinado. O NMP de *Thiobacillus* foi expresso por 100 g de amostra seca.

A Tabela 8 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas cinco porções de 10 mL, cinco porções de 1 mL e cinco porções de 0,1 mL da amostra.

Quando são inoculados mais de três volumes decimais (como neste caso, onde inoculou-se volumes de  $10^0$  a  $10^{-5}$  mL da suspensão da amostra em água destilada estéril), utiliza-se para a composição do código, apenas os resultados positivos correspondentes a três séries consecutivas inoculadas.

O primeiro algarismo escolhido para compor o código é o correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os três algarismos para compor o código. Encontrando-se o código na Tabela 8 e o NMP a ele correspondente, o valor final do NMP é obtido através da fórmula:

$$\text{NMP}/100 \text{ g} = \text{Índice de NMP} \times \frac{10}{\text{MVI}}$$

Onde:

Índice de NMP = valor do índice de NMP encontrado na Tabela 8, correspondente ao código

MVI = maior volume inoculado selecionado para compor o código

Cada amostra pode apresentar um teor de umidade diferente; por essa razão, expressou-se o resultado do NMP por 100 gramas de massa seca.

### 3.3.1.2. Ensaios complementares à análise microbiológica quantitativa

Para auxiliar a interpretação dos resultados da análise microbiológica quantitativa, nas amostras de concreto, solo e eflorescência do concreto do reservatório de água do Instituto Butantan, foram realizados dois ensaios complementares:

- Determinação do pH na suspensão da amostra. A medida foi efetuada diretamente da suspensão, após agitação de 200 rpm, por 30 min. Esta medida é importante para observar se o pH da amostra pode influenciar a espécie de *Thiobacillus* encontrada;
- Determinação da massa seca da amostra. Esta determinação é importante para se expressar o NMP de *Thiobacillus* por 100g de amostra seca. Para que os dados possam ser comparados, contagem de bactérias heterotróficas e fungos também foi expressa por 100 g de amostra seca.

Para a determinação da massa seca de amostra, pesou-se uma porção homogênea da amostra, em uma cápsula de porcelana, previamente seca. Em seguida, colocou-se a cápsula com a amostra em estufa a  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 horas, para eliminação da umidade. Ao final do tratamento térmico o conjunto foi esfriado, em dessecador, até atingir massa constante anotando-se a massa encontrada. O valor porcentual do resíduo é obtido através da expressão:

$$P = \frac{M_2}{M_1} \times 100$$

P = porcentagem da amostra seca em relação à amostra úmida

$M_1$  = massa inicial da amostra úmida (g)

$M_2$  = massa final da amostra seca(g)

A umidade da amostra, em porcentagem, foi obtida através da diferença entre a massa inicial e a massa final da amostra.

### 3.3.1.3. Contagem em placas de bactérias heterotróficas

A determinação da concentração de bactérias heterotróficas, em uma amostra, baseia-se no princípio de que, definindo-se condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, as bactérias viáveis podem se desenvolver nas condições estabelecidas, formando

colônias, observáveis após determinado período de incubação. Volumes decimais adequados da amostra são inoculados em placas de Petri, adicionando-se a seguir o meio sólido Agar Triptona Extrato de Levedura. Após o período estabelecido para a incubação, é feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL com o auxílio de um contador tipo Quebec ou similar. Este método foi efetuado conforme critérios estabelecidos pela Norma Técnica CETESB L5.201<sup>(22)</sup>.

A concentração das bactérias é obtida multiplicando-se a média das contagens das colônias por placa, pela diluição utilizada, e o resultado é expresso como número de unidades formadoras de colônia de bactérias por mL. Como neste caso 1 mL da suspensão corresponde a 0,1g da amostra, é necessário corrigir esta diferença e depois descontar a umidade da amostra. Embora a contagem de bactérias heterotróficas, a partir de amostras sólidas e semi-sólidas, normalmente seja expressa em UFC/g de amostra seca, neste caso, foi adotado como UFC/100 g de amostra seca, para que os resultados pudessem ser comparados com a expressão mais comum para o NMP de *Thiobacillus* que, em amostras ambientais é dado por 100 g de amostra seca.

#### 3.3.1.4. Contagem de fungos

A contagem dos fungos em uma amostra baseia-se no princípio de que, em condições adequadas de nutrição, temperatura e tempo de incubação, os fungos viáveis presentes, com capacidade de se desenvolverem nas condições estabelecidas, formam colônias observáveis após determinado período de incubação. Para isto, são inoculados em placa de Petri, volumes decimais adequados da amostra, adicionando-se a seguir o meio de cultura "Agar Sabouraud Dextrose". Após o período de incubação estabelecido, é feita a contagem das colônias com o auxílio de um contador tipo Quebec ou similar. Para a execução desta técnica utilizou-se os critérios estabelecidos pela norma Técnica CETESB L5.204<sup>(23)</sup>.

O resultado foi expresso como número de colônias de fungos por grama de amostra obtido pela contagem de UFC nas placas em duplicata, calculando-se a média entre as contagens, e, multiplicando-se o valor encontrado pela diluição utilizada, corrigindo-se o valor obtido por grama de amostra seca. O resultado final, neste caso, da mesma forma que para a contagem de bactérias heterotróficas, foi expresso em UFC/100g de amostra seca.

### 3.3.1.5. Teste qualitativos para bactérias redutoras de sulfato

Este teste foi realizado com o objetivo de investigar se a fonte de enxofre reduzido, para os *Thiobacillus*, poderia estar sendo produzida por bactérias redutoras de sulfato.

Utilizou-se o meio de Starkey como estabelecido na Norma Técnica CETESB<sup>(20)</sup>, porém não se aplicou a técnica dos tubos múltiplos. Realizou-se um ensaio qualitativo, inoculando-se a amostra diretamente no meio de Starkey em condições de anaerobiose, por um período de 21 dias, à temperatura de 20°C.

As bactérias redutoras de sulfato reduzem, em anaerobiose, o sulfato contido no meio de cultura a sulfeto de hidrogênio que, reagindo com os íons ferro, formam o sulfeto férrico, o qual confere coloração negra ao meio. Esta mudança visual indica a presença de BRS na amostra.

### 3.3.2. Composição química da matriz do concreto (estudo-de-caso)

#### 3.3.2.1. Reconstituição de traço

A análise química da matriz foi efetuada em duas regiões : uma região seca, sem vazamento de água, e uma região com vazamento de água. Estas análises foram realizadas com o objetivo de conseguir-se a reconstituição de traço destas duas regiões, e também com o objetivo de observar se este concreto teria, na sua composição, um sulfeto potencialmente oxidável pelos *Thiobacillus*.

Estas análises químicas foram efetuadas pelo Laboratório de Química dos Materiais, no Agrupamento de Materiais de Construção civil, Divisão de Engenharia civil do IPT , conforme critérios estabelecidos no Boletim IPT N° 25<sup>(36)</sup>

#### 3.3.2.2. Difração de raios X :

A análise de difração de raios X foi efetuada e interpretada pelo Laboratório de Difração de raios X do departamento de Mineralogia do Instituto de Geociências da USP : com um difratômetro de raios X URD-6, radiação  $\text{CuK}\alpha$ , 40kV e 20 mA. As amostras foram trituradas em granulometria de argila. O objetivo desta análise foi observar a característica da região apresentando eflorescência.

### 3.3.3. Testes presuntivos qualitativos para *Thiobacillus*

O teste presuntivo qualitativo foi efetuado em amostras de areias destinadas à construção civil, coletadas de localidades distintas, amostras de lodo em contato com o concreto de uma estação de tratamento de água, material superficial raspado do concreto de um captador de água bruta, e em amostra de eflorescência do concreto de uma piscina olímpica.

O objetivo da realização deste teste em amostras de naturezas diferentes e localidades distintas, foi obter informações a respeito da presença deste gênero de bactérias no meio ambiente. As características das amostras coletadas do ambiente construído estão descritas na Tabela 5 e as características das amostras de areia estão descritas na Tabela 6.

Foram utilizados os mesmos meios de cultura aplicados na técnica dos tubos múltiplos para a determinação do NMP de *Thiobacillus*. No teste qualitativo, cada amostra foi inoculada em duplicata.

### 3.3.4. Obtenção de cultura pura e identificação de *Thiobacillus*

Os testes presuntivos quantitativos e qualitativos, por serem efetuados com meios de cultura seletivos, indicam a presença de uma determinada espécie de *Thiobacillus* na amostra analisada. No entanto, para se identificar a espécie em questão, é necessário direcionar o isolamento e purificação de uma cepa. Somente com a cepa pura é possível realizar os testes preliminares para identificação.

Os critérios para a identificação preliminar dos *Thiobacillus* incluem várias etapas:

- Seleção por passagens sucessivas em meio mineral;
- Isolamento em meio sólido;
- Purificação das cepas isoladas, baseando-se nas características morfológicas das bactérias;
- Testes fisiológicos com a cepa pura, incluindo testes de crescimento em meio de cultura com variação do pH inicial e teste de crescimento em função do tempo; e
- Testes preliminares para a identificação da espécie.

#### 3.3.4.1. Seleção por passagens sucessivas em meio mineral

Partindo-se dos meios inoculados com resultado positivo para os testes presuntivos, efetuaram-se 5 repiques sucessivos em meio líquido de cultura seletivo para cada espécie. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de 28 °C, em aerobiose. Utilizou-se 5% de inóculo em relação ao volume total de meio de cultura.

Para a seleção de *T.thiooxidans* da amostra de Itaquaquecetuba utilizou-se o meio líquido 9K-S<sup>0</sup>, sob agitação de 300 rpm, durante um período de 15 dias para cada repique. A indicação do crescimento foi observada pela diminuição do pH no meio líquido (pH inicial = 2,8 e pH final < 1,0). Para a amostra de Biritiba Mirim foi utilizado o meio líquido de Postgate modificado para *T.thiooxidans* em condições estáticas.

Para a seleção de *T.ferrooxidans*, utilizou-se o meio líquido 9K-Fe<sup>2+</sup> sob agitação de 300 rpm por um período de 5 dias para cada repique. Quando o meio de cultura apresentou indicação de Fe<sup>3+</sup>, por mudança de coloração com o aparecimento de precipitado alaranjado, em menor tempo, o período de incubação, para cada repique, foi diminuído para 3 e 2 dias.

Para a seleção de *T.thioparus* utilizou-se o meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus* sob condições estáticas, por um período de incubação de 15 dias para cada repique.

Este procedimento em meio seletivo por diluição do inóculo inicial, foi uma etapa efetuada antes do isolamento em meio sólido. Esta técnica permitiu selecionar por pressão seletiva, as bactérias que foram capazes de crescer nos meios líquidos de cultura adequados para cada espécie de *Thiobacillus*

A diluição sucessiva do inóculo inicial possibilitou a diminuição da concentração de compostos químicos trazidos pela amostra. Portanto, este procedimento inibiu a proliferação de outros microrganismos que pudessem estar nutrindo-se destes compostos.

#### 3.3.4.2. Isolamento das colônias em meio sólido seletivo

O isolamento em meio sólido de cultura foi efetuado após o 5<sup>o</sup> repique da etapa de enriquecimento por diluição. Foram utilizados os seguintes meios sólidos:

- Meio sólido ATCC 238 Tiosulfato-agar (*T. thiooxidans*);
- Meio sólido de Postgate modificado para *T. thiooxidans* (*T. thiooxidans*);

- Meio sólido de Postgate modificado para *T.thioparus* (*T.thioparus*); e
- Meio 9K- Fe<sup>2+</sup> com agarose como agente solidificante (*T.ferrooxidans*).

A agarose foi usada como agente solidificante no meio de 9K- Fe<sup>2+</sup> porque segundo GARCIA JR<sup>(30)</sup> a espécie *T.ferrooxidans* sofre inibição por compostos orgânicos do agar.

Os inóculos líquidos foram plaqueados, na forma de estria, sobre os meios sólidos respectivos para cada espécie. Após a obtenção de colônias isoladas iniciou-se a etapa de purificação das culturas.

#### 3.3.4.3. Purificação das culturas a partir de colônias isoladas

A purificação das culturas foi feita nos mesmos meios sólidos utilizados para a obtenção das colônias isoladas.

As colônias isoladas foram replaqueadas nos meios sólidos seletivos para cada espécie. A partir desta cultura observaram-se duas condições:

- As características macromorfológicas das colônias; e
- As características micromorfológicas das culturas.

Somente as culturas constituídas de colônias de bacilos Gram-negativos foram mantidos para prosseguir na obtenção de cepa pura. Para garantir a pureza da cepa, uma colônia da primeira placa foi semeada em uma segunda placa, do mesmo meio. Uma destas colônias isoladas foi inoculada em meios líquidos seletivos, para realização de testes fisiológicos em diferentes valores de pH, testes de crescimento em função do tempo e os testes preliminares de identificação. A Figura 21 mostra um esquema do procedimento para obtenção de colônias isoladas e cultura pura de *Thiobacillus*.

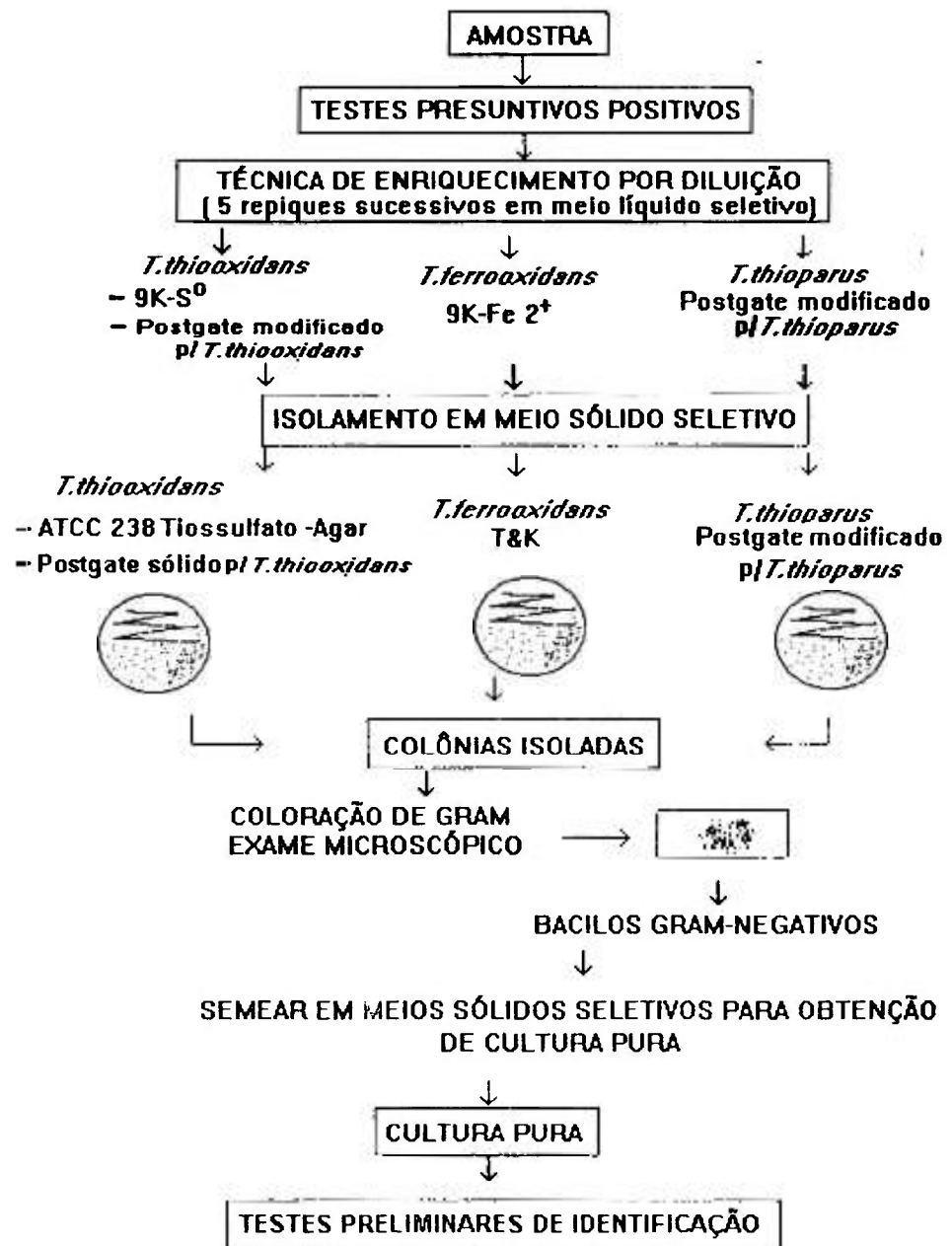


Figura 21 : Esquema do procedimento para isolamento e purificação dos testes presuntivos positivos para *Thiobacillus*

#### 3.3.4.4. Testes com os isolados em meios de cultura com variação do pH inicial .

Para confirmar o comportamento acidofílico ou neutrofilico de algumas cepas isoladas, efetuou-se o crescimento das mesmas, em condições de temperatura e oxigenação adequadas, porém alterando-se o pH do meio de cultura. Utilizou-se os meios de Postgate modificado para *T.thioparaus*, meio de Postgate modificado para *T.thiooxidans*, meio ATCC 238 contendo 1% de enxofre elementar (em pH=4,5), uma adaptação do meio ATCC 238 com pH inicial = 12, meio ATCC contendo 0,5% de tiosulfato de sódio (em pH=7,5) e meios sólidos S6 e S5.

#### 3.3.4.5. Curva de crescimento

As cepas neutrofilicas isoladas apresentaram indicação do crescimento, com viragem do indicador ácido-base, após duas semanas de incubação. Um conjunto de testes preliminares<sup>(35)</sup> para identificação de *Thiobacillus* sugerem algumas condições padronizadas para o ensaio.

Uma destas condições é de que a cepa purificada, a ser identificada, deve ser incubada em meio líquido S6 (neutrofilicas) ou S5(acidofilicas), durante três dias, para servir como inóculo nos vários testes para identificação. Para observar se este inóculo estaria com uma concentração significativa de *Thiobacillus*, efetuou-se um estudo do crescimento, de cinco cepas neutrofilicas e uma cepa acidofilica, em função do tempo de incubação (dias). O crescimento foi acompanhado pela contagem de UFC nos respectivos meios sólidos. Os testes foram efetuados em duplicata e observados por um período de 7 dias de incubação.

#### 3.3.4.6. Testes preliminares para identificação de *Thiobacillus*

Nos testes preliminares para identificação de *Thiobacillus* selecionados por HUTCHINSON e colaboradores<sup>(35)</sup>, foram utilizados dois tipos de meios como base para as variações de outros meios (S7, S8, S0 + 6% de tiosulfato, S6/S5 +4% de fosfato, S6/S5 + 5% de cloreto do sódio S6/S5 + 1% de enxofre) necessários para a identificação:

- Meio S6 (pH inicial = 6,6) para as cepas neutrofilicas; e
- Meio S5(pH inicial = 5,0) para as cepas acidofilicas.

O Anexo II descreve o procedimento e a fórmula para a elaboração de todos os meios de cultura necessários para os testes de identificação.

**Inóculo:** Utilizou-se 0,02 mL de cada cultura pura após três dias de incubação em meio líquido S6(neutrofilicas) ou S5(acidofilicas) em condições padronizadas. As condições foram padronizadas para 10 mL de meio de cultura líquido, em frasco de vidro Pyrex com capacidade para 100 mL e diâmetro de 5cm, o que permite maior uniformidade na oxigenação do meio do que em tubo de ensaio. Os testes foram realizados à temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e em condições estáticas de aerobiose.

Os testes para *Thiobacillus denitrificans* foram efetuados em tubo de ensaio com 10 mL de meio de cultura líquido S8 e com o tubo de Durham no seu interior. Manteve-se o mesmo período de incubação, porém em condições anaeróbias.

Os testes para observar inibição do crescimento em meios líquidos com fosfato e com cloreto de sódio, foram analisados por microscopia direta, examinando-se a motilidade em gota pendente, pois todas as cepas apresentaram-se móveis em meio líquido. Paralelamente, efetuou-se o plaqueamento em meio sólido S6 ou S5 para confirmação do teste.

Não foi observada a oxidação do tiocianato no meio S7, mas apenas a presença ou ausência de crescimento das bactérias neste meio sólido.

O teste no meio de cultura contendo ditionato não foi efetuado. Todos os testes foram realizados em duplicata com controle sem inóculo para todos os meios testados.

A porcentagem de oxidação de tiosulfato foi analisada por iodometria, quantificando-se o iodo consumido pelo tiosulfato remanescente no meio de cultura após o período de incubação estabelecido<sup>(89)</sup>.

A Figura 22 esquematiza o preparo do inóculo e os testes necessários para a identificação dos isolados em estudo.

A Tabela 9 apresenta os testes propostos por HUTCHINSON<sup>(35)</sup>, onde o autor descreve os meios utilizados, os critérios para avaliação, os grupos e a espécie que melhor representa cada grupo.

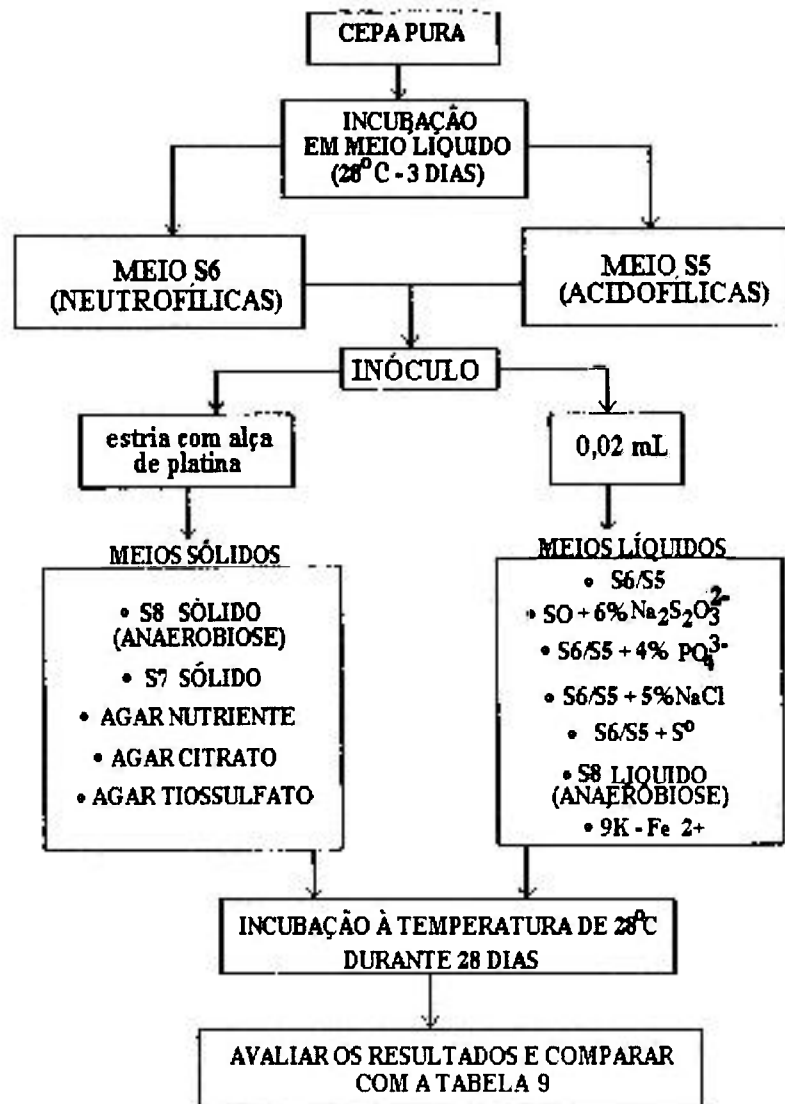


Figura 22 : Esquematização do procedimento para o preparo do inóculo e dos testes para a identificação dos *Thiobacillus*.

Tabela 9 : Testes preliminares para identificação de *Thiobacillus* (HUTCHINSON e colaboradores<sup>(35)</sup> )

Meio de cultura	Espécie	A	B	C	D	E	F	G	H	I
		Grupo	0	1a	1	2	3	4	5	6
Critério de avaliação										
S6 /S6	pH final	>6,6	6,5-5,0	6,6-5,0	6,6-5,0	6,6-3,5	3,5-2,8	<2,0	<2,0	>2,0-<2,8
S6 /S5	Oxidação do tiosulfato	<90%	<50%	<30%	<90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
SO + 6% tiosulfato	Oxidação do tiosulfato	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	>10%	>10%	<10%	<10%
S6 / S5 + 4% fosfato	Inibição	+/-	+	+	+	+	-	-	+	+
S6/ S5 + 5% NaCl	Inibição	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+
Enxofre S8	pH final	s/c	6,1-6,25	s/c	5,15-	4,6-4,1	3,2-2,8	<2,0	<2,0	>2,0-<2,8
Anaerobiose S7	Crescimento	+	+	-	+	+/-	-	-	-	-
	Formação de gás	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Oxidação do tiocianato	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Meio com Fe <sup>2+</sup>	Oxidação de Fe <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Agar nutriente	Crescimento	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Citrato	Crescimento	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Agar tiosulfato	Deposição de S <sup>0</sup>	-	-	+	+	+	+	+	-	+

Onde: A= tipo "trautweinii"; B= grupo 1a; C= *T.novellus*; D= *T.denitrificans*; E= *T.thioparus*; F= *T.neapolitanus*; G= *T.thiooxidans*; H=*T.ferrooxidans*; I= *T.intermedius*.

Símbolos :s/c= sem crescimento

+ = > 90 % das linhagens são positivas

- = >90 % das linhagens são negativas

### 3.3.5. Teste qualitativo para crescimento de cepas de isoladas em meios de cultura de suspensões de materiais de construção

Este teste foi desenvolvido para se obter informações preliminares sobre a capacidade das cepas isoladas conseguirem utilizar, para o seu crescimento, nutrientes dos próprios materiais de construção. Neste caso, especificamente, aqueles contendo escória granulada de alto-forno (com sulfeto de cálcio em sua composição).

Foram elaborados dois tipos de meios de cultura sólidos, um contendo exclusivamente escória granulada de alto-forno como nutriente e o outro com a matriz de concreto analisado em estudo-de-caso.

O meio sólido com a matriz do cimento hidratado foi desenvolvido com intuito especulativo de observar se uma cepa isolada de sua superfície, exposta ao ambiente, é capaz de crescer em um meio contendo uma suspensão desta matriz como nutriente. Neste caso, a amostra utilizada como substrato, foi coletada do concreto do reservatório de água do Instituto Butantan.

#### 3.3.5.1. Meio de cultura sólido contendo escória granulada de alto-forno(COSIPA)

Para observar se os *Thiobacillus* isolados poderiam crescer utilizando somente os nutrientes contidos na escória granulada de alto-forno, idealizou-se um meio de cultura sólido com a seguinte formulação:

Escória granulada de alto-forno-----	200g
Agarose (grau eletroforese)-----	5g
Água destilada-----	1000mL

Para o preparo deste meio foram esterilizados em frascos separados : 1) a escória na forma de pó, 2) 800 mL de água destilada, 3) a agarose dissolvida em 200 mL de água destilada. Autoclavou-se durante 30 minutos, à temperatura de  $121 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$  Após a esterilização, adicionou-se os 800 mL de água na escória e agitou-se vigorosamente. Posteriormente, acrescentou-se a agarose dissolvida (este procedimento deve ser efetuado antes que a agarose atinja seu ponto de solidificação). A mistura final foi distribuída em frações de cerca de 20 mL em placas de Petri, previamente esterilizadas. A preparação do

meio e a distribuição em placas foram efetuadas em fluxo laminar, para evitar a contaminação por microrganismos indesejáveis.

### 3.3.5.2. Análise química da escória granulada de alto-forno utilizada como substrato em meio sólido de cultura.

Esta escória foi gentilmente doada pelo Laboratório de Química dos Materiais de Construção do Agrupamento de Materiais de Construção Civil do IPT . As análises químicas foram efetuadas conforme os métodos descritos a seguir:

- Determinação do resíduo insolúvel (escória) : método descrito na NBR 5744/89<sup>(4)</sup>;
- Anidrido silícico (escória) : método descrito na NBR 5742/77<sup>(3)</sup>;
- Óxido férrico (escória) : método descrito na NBR 5742/77<sup>(3)</sup>;
- Óxido de cálcio (escória) : método descrito na NBR 8347/91<sup>(8)</sup>;
- Nitrogênio total : método semi-automático para determinação de Nitrogênio total pelo método Kjeldahl<sup>(24)</sup>;
- Fósforo total : método semi-automático para determinação de fósforo total<sup>(25)</sup>;
- Anidrido sulfúrico : método descrito na NBR 5745/89<sup>(9)</sup>;
- Sulfeto : método descrito por Voinovitch<sup>(90)</sup>;
- Óxido de titânio : método descrito por Voguel<sup>(89)</sup>;

A Tabela 10 apresenta a composição química da escória granulada de alto-forno utilizada como substrato do meio sólido de cultura.

**Tabela 10 : Composição química da escória granulada de alto-forno (COSIPA)**

<b>Determinações</b>	<b>(%)</b>
<b>Resíduo insolúvel (RI)</b>	<b>2,00</b>
<b>Anidrido silício (SiO<sub>2</sub>)</b>	<b>35,02</b>
<b>Óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</b>	<b>11,32</b>
<b>Óxido de cálcio (CaO)</b>	<b>43,07</b>
<b>Óxido de magnésio (MgO)</b>	<b>5,97</b>
<b>Óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</b>	<b>0,03</b>
<b>Óxido de manganês (Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)</b>	<b>0,72</b>
<b>Dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>)</b>	<b>0,43</b>
<b>Óxido de sódio (Na<sub>2</sub>O)</b>	<b>0,15</b>
<b>Óxido de potássio (K<sub>2</sub>O)</b>	<b>0,44</b>
<b>Sulfeto (S<sup>2-</sup>)</b>	<b>0,95</b>
<b>Nitrogênio total</b>	<b>0,08</b>
<b>Fósforo total</b>	<b>0,01</b>

### 3.3.5.3. Meio de cultura sólido contendo matriz de concreto.

Este meio foi elaborado com a seguinte formulação:

Matriz do concreto(seca e triturada)-----	0200g
Agarose (grau eletroforese)-----	0005g
Água destilada-----	1000mL

O preparo deste meio foi idêntico ao descrito para o meio de escória granulada de alto-forno.

O esquema para o preparo dos meios sólidos de cultura contendo materiais de construção em suspensão pode ser visto na Figura 23 .

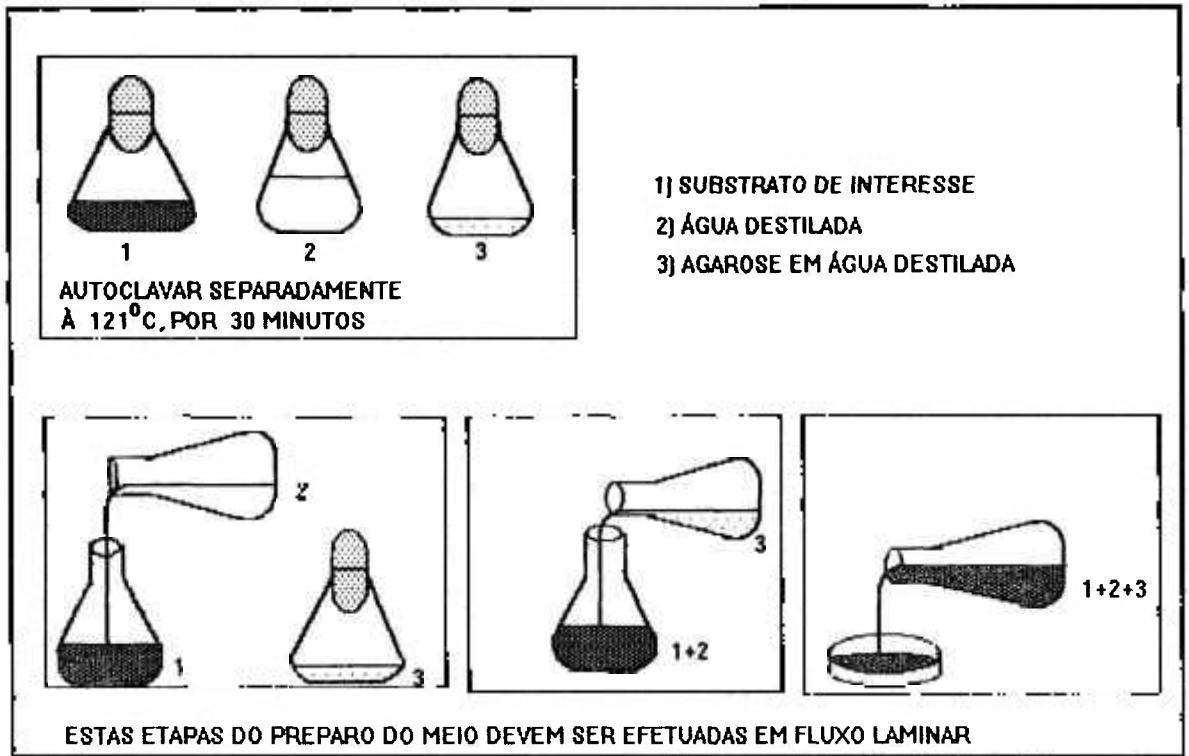


Figura 23 : Esquema do procedimento para a produção de meio sólido de cultura contendo suspensões de materiais de construção.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resultados obtidos em estudo-de-caso

#### 4.1.1. Resultados das análises microbiológicas quantitativas

Os resultados referentes ao estudo-de-caso do concreto deteriorado do reservatório de água do Instituto Butantan, são apresentados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14. A Tabela 11 mostra os microrganismos quantificados por 100g de amostra seca. A Tabela 12 mostra o valor do pH e o teor, em porcentagem, da umidade das amostras analisadas; estes resultados referem-se às amostras coletadas em maio de 1992.

Tabela 11: Concentração de microrganismos encontrados por 100g de amostra seca de concreto (reservatório de água do Instituto Butantan)

Microrganismos (teste presuntivo)	Concentração de microrganismos/ 100 g de amostra seca		
	C1	C2	C3
<i>T.thioparus</i> (NMP)	$7,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^7$
<i>T.thiooxidans</i> (NMP)	<2	<2	$2,2 \times 10^3$
<i>T.ferooxidans</i> (NMP)	<2	<2	<2
<i>T.denitrificans</i> (NMP)	<2	<2	$7,5 \times 10^3$
Fungos (UFC)	$5,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
Bactérias heterotróficas (UFC)	$2,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$8,1 \times 10^8$
Bactérias redutoras de sulfato (teste qualitativo)	ausente	presente	não determinado

C1 = amostra da região com eflorescência

C2 = amostra da região do concreto com corrosão da armadura

C3 = amostra de solo em contato com a base da estrutura de concreto

Tabela 12 : Características das amostras de concreto deteriorado: estudo-de-caso

Determinações	C1	C2	C3
pH	9,0	10,0	9,5
Umidade (%)	56	5	22

#### 4.1.2. Resultados da análise microbiológica em períodos diferentes coleta

As amostras C1 e C2 foram coletadas em duas épocas diferentes do ano, a primeira amostragem foi feita no final do verão (março) e a segunda no outono (maio). Notou-se que os resultados da coleta efetuada em maio apresentou um decréscimo do NMP de *T.thioparus* (teste presuntivo) em relação à coleta efetuada em março. Estes resultados indicam a importância de serem realizados estudos futuros para observar a influência da variação sazonal na biodeterioração deste concreto. Os resultados comparativos dos dois períodos de coleta estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 : Número mais provável de *Thiobacillus* obtidos do concreto deteriorados em períodos diferentes de coleta

	C1		C2	
Data da coleta	18/03/92	25/05/92	18/03/92	25/05/92
pH	9,60	8,95	9,70	10,0
<i>T.thioparus</i>	$2,4 \times 10^7$	$3,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$

Os valores obtidos para *T.thioparus* (teste presuntivo) são expressos em NMP/100mL da suspensão da amostra analisada.

#### 4.1.3. Resultados da análise química da matriz

Os resultados da análise química da matriz, analisada em estudo-de-caso, permitiram a sua reconstituição de traço (proporção aglomerante : agregado). A Tabela 14 mostra a composição química em duas regiões diferentes: uma onde o concreto apresentava-se seco e outra onde o concreto apresentava-se úmido, com vazamento.

Tabela 14 : Composição química da matriz analisada em estudo-de-caso - reservatório de água do Instituto Butantan

Análises	Amostra seca massa(%)	Amostra com vazamento massa(%)
Umidade	0,96	0,58
Perda ao fogo	9,10	7,40
Resíduo insolúvel (RI)	74,90	80,03
Óxido de Silício (SiO <sub>2</sub> )	2,69	2,24
R <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	1,82	1,58
Óxido de cálcio (CaO)	9,82	7,42
Óxido de magnésio (MgO)	0,60	0,53
Sulfato	0,01	0,02
Sulfeto (S <sup>2-</sup> )	0,01	0,01
Nitrogênio total	0,03	0,01
Fósforo total	0,04	0,05

A reconstrução de traço da matriz, revelou uma proporção 1:4 (cimento:agregado miúdo), em massa, para a amostra da região seca e uma proporção 1:6 para a amostra da região com vazamento. A diferença no traço pode ser explicada pela lixiviação de cimento.

Os resultados da difração de raios X indicaram que a amostra de eflorescência continha calcita. (CaCO<sub>3</sub>).

#### 4.1.4. Discussão dos resultados

A origem do processo de deterioração do concreto, neste caso específico, parece decorrer de falhas na execução da obra. A corrosão da armadura é favorecida pela falta de cobrimento. A carbonatação local, que se dá ao longo do tempo, diminui a alcalinidade do concreto e acelera a corrosão. A umidade do concreto com conseqüente carbonatação e diminuição da alcalinidade, parece contribuir para o estabelecimento de condições ambientais iniciais necessárias para a colonização dos microrganismos. A literatura<sup>(43, 69)</sup> não apresenta dados que evidenciem o crescimento de *Thiobacillus* neutrofilicos em pH entre 12 e 11, intervalo em que o concreto ainda não se encontra carbonatado.

A análise química da argamassa deste reservatório de água indicou, pelo teor de sulfeto encontrado, a possibilidade do cimento utilizado conter aproximadamente 10% de adição de escória granulada de alto-forno.

As bactérias redutoras de sulfato, que produzem gás sulfídrico pela redução do sulfato, foram encontradas somente na amostra com corrosão da armadura.

Conforme se observa na Tabela 11, as amostras apresentaram bactérias heterotróficas, fungos e indicação para *Thiobacillus*, presentes em quantidades representativas, coexistindo no mesmo nicho, embora em amostras distintas. A presença dos mesmos tipos de microrganismos nas três amostras indica que a contaminação parece vir do solo, pois este, além de apresentar os mesmos tipos de microrganismos encontrados no concreto, apresenta também teste para presuntivo positivo para espécie anaeróbia de *Thiobacillus* e para *T.thiooxidans* (espécie aeróbia acidofílica).

Quando foram comparados os resultados obtidos no estudo-de-caso e os resultados encontrados na literatura, observou-se que:

- A indicação de *Thiobacillus* com características neutrofílicas nas amostras de eflorescência e de concreto com corrosão da armadura, permite supor que no caso de não ocorrer interrupção deste processo com reparo do concreto, em tempo hábil, a alcalinidade do concreto pode diminuir a ponto de favorecer a colonização de espécies acidofílicas provenientes do solo para o concreto. Esta suposição foi levantada quando se comparou os resultados obtidos neste estudo com os resultados encontrados por MILDE<sup>(51)</sup>, que observou a biodeterioração do concreto do esgoto de Hamburgo como sendo um processo sequencial de desenvolvimento de várias espécies de *Thiobacillus*; onde as espécies neutrofílicas, capazes de crescer em pH neutro e alcalino, acidificam o meio, favorecendo o crescimento de espécies acidofílicas.
- A concentração de bactérias heterotróficas em quantidades superiores à concentração de *Thiobacillus* (teste presuntivo), nas amostras de eflorescência e concreto com corrosão da armadura, coincidem parcialmente com a hipótese apresentada por KARAVAIKO<sup>(41)</sup> para o mecanismo de biodeterioração do concreto. Esta hipótese supõe que as bactérias heterotróficas iniciam o processo, crescendo sobre a superfície do concreto com a formação de nichos anaeróbios. Nestas micro-regiões anaeróbias as bactérias redutoras de sulfato se proliferam, produzindo gás sulfídrico; este, por sua vez, serve de fonte de energia para as bactérias sulfoxidantes. Esta associação de microrganismos pode estar ocorrendo na amostra de concreto com corrosão da armadura, analisada neste estudo-de-caso, pois nesta amostra foram encontradas bactérias heterotróficas, e indicação para bactérias redutoras de sulfato e *Thiobacillus*.

- A indicação de bactérias redutoras de sulfato, na amostra de concreto com corrosão da armadura exposta, é coincidente com a proposta para o mecanismo de biocorrosão das armaduras apresentado por MOOSAVI<sup>(52)</sup>. É interessante observar que, neste estudo-de-caso, as armaduras apresentavam-se expostas ao ambiente, portanto, em uma condição oxidante. A presença destas bactérias, estritamente anaeróbias, confirma a existência de nichos anaeróbios em microrregiões do concreto com armadura exposta

## **4.2. Testes presuntivos qualitativos para *T. thioparus***

### **4.2.1. Resultados dos testes presuntivos em amostras do ambiente construído**

As características das amostras analisadas estão descritas na Tabela 5 (Capítulo III) e os resultados estão apresentados na Tabela 15 .

Tabela 15 Resultados dos testes presuntivos qualitativos para *T.thioparus* em amostras coletadas a partir do ambiente construído

Procedência	Amostra (Código)	<i>T.thioparus</i>		pH
ETA Riacho Grande São bernardo do Campo(S. P.)	C.4	+	+	6,70
ETA Riacho Grande São bernardo do Campo(S. P.)	C.5	+	-	7,00
ETA Riacho Grande São bernardo do Campo(S. P.)	C.6	+	-	7,20
Captador de água bruta Guarapiranga São Paulo (S.P.)	C.7	-	-	7,90
Captador de água bruta Guarapiranga São Paulo (S.P.)	C.8	-	-	9,50
Captador de água bruta Guarapiranga São Paulo (S.P.)	C.9	-	-	8,10
Piscina olímpica (CEPEUSP) Cidade Universitária São Paulo (S.P.)	C.10	+	+	10,3
Piscina olímpica (CEPEUSP) Cidade Universitária São Paulo (S.P.)	C.11	+	+	8,3

C.4 = Lodo em contato com viga de ferro com corrosão evidente

C.5 = Lodo em contato com o concreto em deterioração

C.6 = Lodo coletado do fundo do decantador

C.7 = Agregado graúdo envolvido por cimento hidratado

C.8 = Pequena amostra de concreto

C.9 = Material superficial raspado do concreto, contendo limbo escuro

C.10 = Estalactites de eflorescência do concreto com vazamento de uma piscina olímpica

C.11 = Cano apresentando corrosão evidente abaixo de uma região do concreto apresentando vazamento de água com formação de estalactites.

#### 4.2.2. Discussão dos resultados

Os testes presuntivos qualitativos foram positivos para as amostras procedentes da ETA do Riacho Grande e da piscina olímpica do CEPEUSP, Cidade Universitária - S.P.. Para as amostras procedentes do captador de água bruta da represa de Guarapiranga todos os testes tiveram resultados negativos. Algumas considerações são discutidas quanto a estes resultados:

- Quanto aos resultados positivos para as amostras da ETA do Riacho Grande, São Bernardo do Campo:

É interessante observar que as amostras de lodo da ETA do Riacho Grande foram coletadas de um decantador de água pré-tratada, já clorada, portanto indicando que os

*Thiobacillus* presentes nestas amostras resistiram ao processo de cloração no tratamento da água.

- Quanto aos resultados positivos para as amostras coletadas do concreto da piscina olímpica:

A indicação da presença de *T.thioparus* nas amostras de estalactites do concreto da piscina olímpica do CEPEUSP, Cidade Universitária, é coincidente com a indicação da presença destas bactérias nas estalactites formadas por eflorescência do concreto do reservatório de água do Instituto Butantan. É interessante observar que ambas as amostras apresentavam-se carbonatadas.

O teste presuntivo positivo para *T. thioparus* na amostra de cano de ferro com corrosão evidente, situado abaixo do concreto com vazamento de água da piscina olímpica, indica a possibilidade destas bactérias estarem fazendo parte do processo de corrosão dessa liga de ferro nessas condições.

- Quanto aos resultados negativos das amostras superficiais de concreto do captador de água bruta da represa de Guarapiranga:

Os resultados negativos para o teste presuntivo nas amostras procedentes do captador de água bruta da represa de Guarapiranga não indicam necessariamente ausência de *T. thioparus* nestas amostras. Observou-se uma mudança na coloração do meio de Postgate modificado para *T. thioparus* em relação ao controle não inoculado. O controle permaneceu com a coloração vermelha típica do pH inicial do meio =7,4; os meios inoculados, no entanto, apresentaram coloração carmim intensa, típica do indicador vermelho de fenol em meio alcalino com pH acima de 8,0.

Estas amostras, utilizadas como inóculo, carregavam consigo uma certa quantidade de cimento hidratado do concreto. Este fato esclarece a mudança na coloração do meio de cultura nas amostras inoculadas : o hidróxido de cálcio, do cimento hidratado, ao ser solubilizado, libera íons OH<sup>-</sup> elevando o pH do meio. A alcalinização do meio pode inibir o crescimento dos *Thiobacillus* ou mascarar o teste por neutralização do ácido produzido.

Estas observações levantam a questão de que a utilização do concreto, diretamente como inóculo, não é aconselhável. Mesmo num teste qualitativo, é necessário usar uma suspensão do concreto em paralelo com o concreto puro.

O aumento da alcalinidade do meio também foi observado em um teste de sobrevivência efetuado com algumas cepas acidofílicas incorporadas na água de amassamento para a confecção de um corpo-de-prova de argamassa. Quando se inoculou os corpos-de prova em meio líquido 9K contendo 1% de enxofre com pH inicial de 2,8; o pH do meio chegava a 9,0 após um período de sete dias incubação.

#### **4.3. Testes presuntivos qualitativos para *T.thioparus*, *T.thiooxidans* e *T.ferrooxidans***

##### **4.3.1. Resultados dos teste presuntivos em amostras de areia**

Foram analisadas amostras de areias de diferentes procedências, encontrando-se as características de cada amostra na Tabela 6 Os resultados dos testes presuntivos qualitativos para *T.thioparus*, *T.thiooxidans* e *T.ferrooxidans* estão apresentados na Tabela 16 .

Tabela 16 :Resultado do teste presuntivo para *Thiobacillus* de areias de procedências diferentes

Procedência	Amostra (código)	Microgasnismos					
		<i>T.thioparus</i>		<i>T.thiooxidans</i>		<i>T.ferrooxidans</i>	
Biritiba Mirim	A.1	+	+	+	+	+	+
Biritiba Mirim	A.2	+	+	+	+	-	+
Biritiba Mirim	A.3	+	-	+	-	-	-
Biritiba Mirim	A.4	-	-	+	-	-	-
Biritiba Mirim	A.5	-	-	-	-	-	-
Jacareí	A.6	+	+	-	-	-	-
Jacareí	A.7	+	+	-	-	-	-
Jacareí	A.8	+	-	-	-	-	-
Itaquaquetuba	A.9	-	-	+	+	-	-
Itaquaquetuba	A.10	-	-	+	+	+	+

- A.1 = Areia bruta coletada no meio do monte  
A.2 = Areias bruta coleta em um canto do monte  
A.3 = Areia lavada (molhada) em contato com o piso  
A.4 = Areia lavada (molhada) de região superior do monte  
A.5 = Areia lavada após secagem de região superior do monte  
A.6 = Areia úmida coletada da região superior do monte  
A.7 = Areia úmida coletada de região não exposta à atmosfera  
A.8 = Areia úmida em contato com o solo  
A.9 = Areia final para distribuição  
A.10 = Arenito cimentado por sulfetos

#### 4.3.2. Discussão dos resultados

Somente as amostras procedentes do porto de areia de Itaquaquecetuba foram coletadas no próprio porto, aquelas procedentes dos portos de Jacareí e de Biritiba Mirim foram coletadas após o transporte, dentro das expectativas de manipulação das areias destinadas à construção civil.

A literatura não registrava qualquer tipo de dados referentes à presença de *Thiobacillus* em amostras de areia destinada à construção civil. O primeiro passo importante deste estudo foi constatar a ubiquidade deste gênero de bactérias nas amostras analisadas.

As amostras provenientes de Biritiba Mirim, coletadas no Setor de Areias do IPT, apresentaram algumas variações no teste qualitativo para *Thiobacillus* provavelmente em função das diferenças no tratamento efetuado para a produção de areia preparada para ensaio de cimento (2). Neste processo as areias são lavadas com hidróxido de sódio e submetidas à secagem.

As amostras de areia bruta, ou seja sem tratamento, apresentaram a indicação para os três tipos de bactéria. As amostras de areia lavada, em contato com o piso de cimento, apresentaram indicação para *T.thiooxidans* e para *T.thioparus*. Uma amostra de areia lavada, ainda molhada antes da secagem, da região superior do monte apresentou indicação de *T.thiooxidans*. O teste presuntivo positivo para estas amostras, após lavagem, implica em uma provável recolonização por cepas do ambiente. A areia lavada após secagem não apresentou indicação para presença de *Thiobacillus* pois não apresenta condições de umidade adequadas ao crescimento microbiano.

A areia proveniente de Jacareí apresentou apenas indicação de *T. thioparus*, embora estivesse exposta a céu aberto com condições ambientais propícias para a contaminação por outras espécies que pudessem estar eventualmente presentes no meio ambiente.

A amostra de areia Itaquaquecetuba, apresentou indicação para *T. thiooxidans*. A presença de *T. ferrooxidans* foi observada na amostra de arenito, coletada no porto 5, este arenito não é utilizado diretamente como areia para construção civil, mas faz parte da composição da areia final.

Em resumo, observou-se que a utilização da areia diretamente como inóculo não compromete os resultados dos testes presuntivos qualitativos.

#### **4.4. Isolamento e identificação preliminar para *Thiobacillus***

##### **4.4.1. Resultado do processo de isolamento de cepas puras**

Partindo-se dos resultados positivos dos testes presuntivos quantitativos e qualitativo realizados, efetuou-se o enriquecimento, o isolamento e a purificação de algumas cepas.

Após o quinto repique em meio líquido efetuou-se o plaqueamento no respectivo meio sólido, iniciando-se a etapa de purificação das cepas, onde as colônias de bactérias isoladas com características macromorfológicas idênticas foram consideradas da mesma cepa. Todos os tipos de colônia foram submetidos à coloração de Gram. Apenas as bactérias Gram-negativas foram selecionadas para prosseguir a purificação. Nesta etapa foram observadas algumas características distintas da macromorfologia das colônias, sumarizadas na Tabela 17.

Foram isoladas onze cepas na forma de cultura pura, das quais dez foram submetidas a um conjunto de testes preliminares para identificação de *Thiobacillus*.

Quando se comparou as características morfológicas das colônias isoladas com as características descritas na literatura<sup>(43)</sup> observou-se que:

As cepas A2Th, A9Th, A10Th apresentam características compatíveis com as colônias de *T.thiooxidans*; as cepas A6Th e C4RG apresentam características compatíveis com *T.thioparus*; as cepas A2Tf e A10Tf apresentam características compatíveis com *T.ferrooxidans*; as cepas C1m e C1e apresentam características compatíveis com *T.versutus*. As características das cepas C1p e C2Ar não coincidiram com alguma espécie em particular.

A Tabela 17 :Características da macromorforfologia das colônias isoladas

<b>Cepa (Código)</b>	<b>Procedência</b>	<b>Meio de cultura (sólido)</b>	<b>Características macroscópicas da colônia</b>
<b>C2Ar</b>	Concreto com armadura exposta (Instituto Butantan)	S6	Colônia pequena (~1 mm), coloração rosa, consistência gelatinosa
<b>C1p</b>	Eflorescência (Instituto Butantan)	S6	Colônia minúscula (~0,5 mm) transparente consistência gelatinosa
<b>C1m</b>	Eflorescência (Instituto Butantan)	S6	Colônia grande (~3 mm) de coloração levemente amarelada no centro, consistência mucilagenosa
<b>C1es</b>	Eflorescência (Instituto Butantan)	S6	Colônia grande (~3 mm), espalhada, consistência mucilagenosa, ao envelhecer adquire coloração amarelada
<b>C4RG</b>	Lodo da ETA - (Riacho Grande)	S6	Colônia pequena (~1 mm), amarelada, seca, com aparente deposição de enxofre
<b>A6Tp</b>	Areia exposta ao ambiente /IPEN (Jacareí)	Postgate modificado p/ <i>T.thioparus</i>	Colônia pequena (~1 mm), amarelada, seca, com aparente deposição de enxofre
<b>A9Th</b>	Areia - (Itaquaquecetuba)	Postgate modificado p/ <i>T.thiooxidans</i>	Colônia pequena (~1 mm), amarelada, pastosa, com aparente deposição de enxofre ao envelhecer adquire cor ocre
<b>A10Th</b>	Arenito (Itaquaquecetuba)	Postgate modificado p/ <i>T.thiooxidans</i>	Colônia pequena (~1 mm), amarelada, pastosa, com aparente deposição de enxofre ao envelhecer adquire cor ocre
<b>A2Th</b>	Areia coletada no Setor de areias do IPT (Biritiba Mirim)	Postgate modificado para <i>T.thiooxidans</i>	Colônia pequena (~1 mm), coloração ocre, seca
<b>A10Tf</b>	Arenito (Itaquaquecetuba)	"TK" com agarose	Colônia minúscula (< 1 mm), seca, coloração alaranjada, aspecto ferruginoso
<b>A2Tf</b>	Areia coletada no Setor de areias do IPT (Biritiba Mirim)	"TK" com agarose	Colônia minúscula (< 1 mm), seca, coloração alaranjada, aspecto ferruginoso

A Figura 24 mostra colônias isoladas das cepa neutrofílica C2Ar ; a Figura 25 mostra colônias isoladas da cepa C1m, ambas em meio sólido S6. E a Figura 26 mostra colônias isoladas da cepa acidofílica A10Tf; o crescimento das colônias desta cepa evidencia a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  com formação de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  de cor ferruginosa.

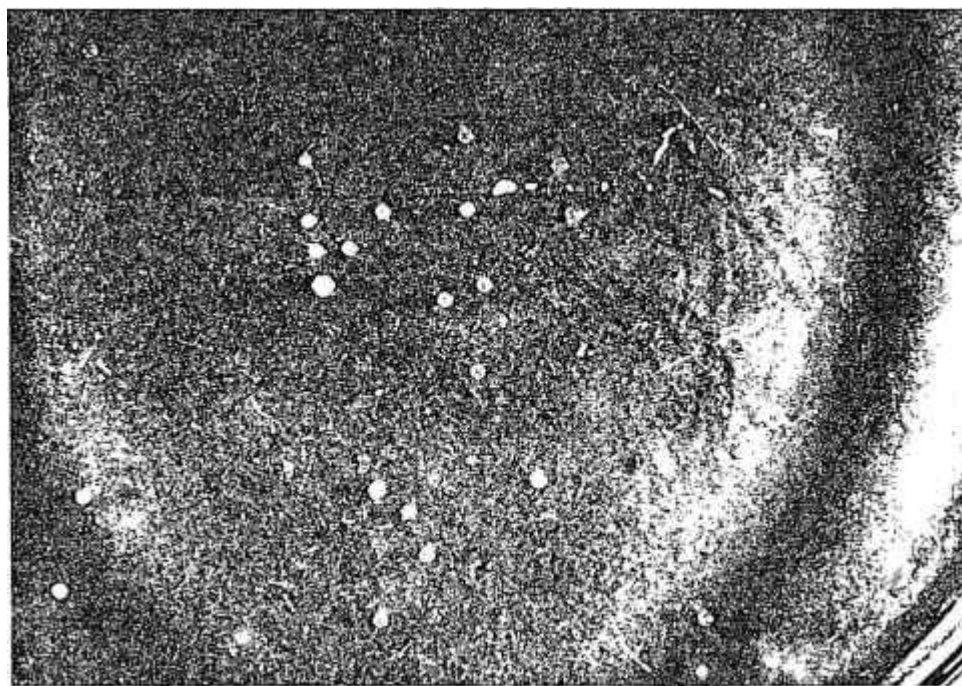


Figura 24 : Cepa C2Ar em meio sólido S6 (isolada do concreto com armadura exposta do reservatório de água do Instituto Butantan) - Ampliação ~ 2x.

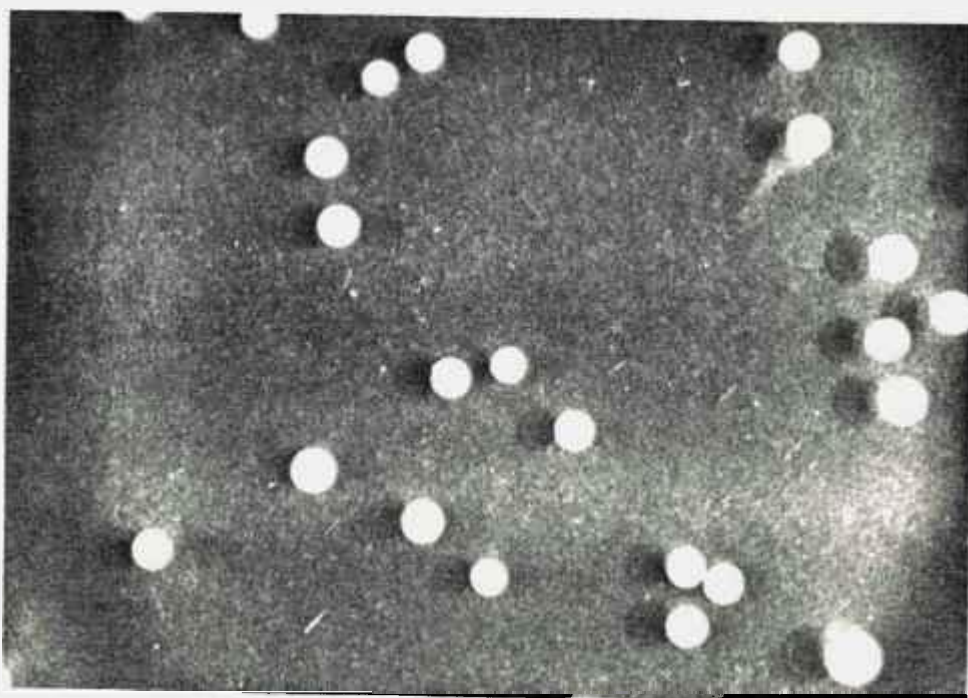


Figura. 25 : Ceba C1m em meio sólido S6 ( isolada da amostra de eflorescência do concreto do reservatório de água do Instituto Butantan) - Ampliação ~ 2,5 x.

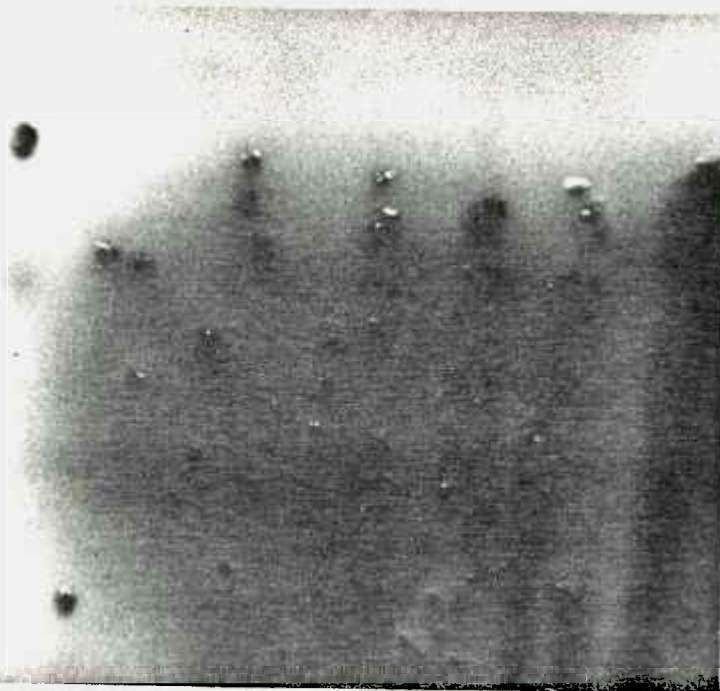


Figura.26 : Ceba A10Tf em meio "TK" sólido com sulfato ferroso (isolada do porto de areia de Itaquaquecetuba - S.P.) - Ampliação ~ 2,5 x.

#### 4.4.2. Resultado do estudo do comportamento de cepas puras em meios de cultura com variação do pH inicial

##### 4.4.2.1. Meio líquido ATCC 238 adaptado para pH inicial = 12

A areia de Itaquaquecetuba apresentou indicação para *T.thiooxidans*; esta espécie é a mais agressiva ao concreto por produzir grande quantidade de ácido sulfúrico como produto final de seu metabolismo. No caso destas bactérias, presentes na areia, conseguem sobreviver às condições de pH elevado da hidratação do cimento, o concreto produzido apresentaria intrinsecamente um risco potencial de biodeterioração.

Para observar a possibilidade da sobrevivência destas bactérias em pH alcalino, estas cepas foram incubadas em meio líquido ATCC 238 com 0,5 % de tiosulfato de sódio, adaptado para pH inicial 12.

A Figura 27 mostra a variação do pH neste meio após 21 dias de incubação, inoculado com as cepas A10Th e A9Th

A variação do pH no meio do frasco controle não inoculado foi idêntica à dos frascos inoculados. Estes resultados indicaram que estas cepas acidofílicas não foram capazes de crescer e produzir ácido nestas condições.

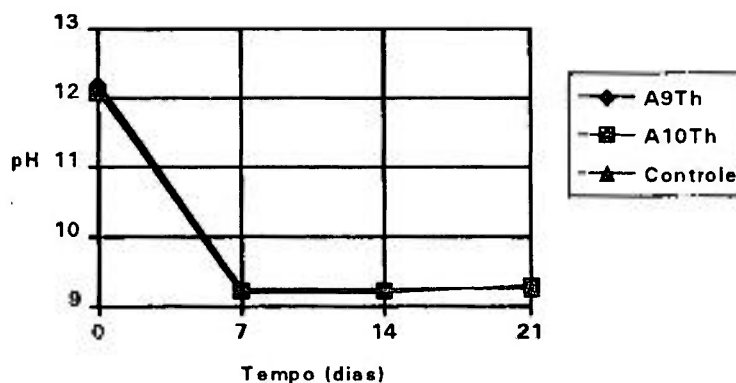


Figura 27 : Variação do pH do meio ATCC 238 contendo 1% S<sup>0</sup> (modificado para pH 12) nos frascos inoculados com as cepas A10Th, A9Th .

Após este período de incubação foram adicionados a estes meios 100 ml de meio ATCC 238 , acidificando-se o meio com ácido sulfúrico esterilizado até que o meio atingisse

pH 4,0. Não houve indicação da presença destas cepas após 14 dias de incubação em condições ótimas.

#### 4.4.2.2. Meio sólido S6 e S5

Segundo a literatura, as cepas neutrofilicas e acidofilicas de *Thiobacillus*, necessitam de meios de cultura com pH inicial próximo neutralidade ou ácido, respectivamente, para iniciar o crescimento. Estes dados foram confirmados com os testes de crescimento realizados em meios sólidos S6 e S5. A Tabela 18 mostra o comportamento de várias cepas isoladas em meio sólido S6(pH inicial = 6,6) e S5 (pH inicial = 4,5).

Tabela 18 : Teste de crescimento em meio sólido S6 e S5 de várias cepas isoladas

<u>Cepa</u>	<u>Meio sólido S6</u>	<u>Meio sólido S5</u>
C2Ar	+	-
C1p	+	-
C1es	+	-
C1m	+	-
C4R.G.	+	-
A10Th	-	+
A9Th	-	+
A2Th	-	+
A10Tf	-	-
A2Tf	-	-

Os resultados obtidos mostraram que nenhuma cepa neutrofilica foi capaz de crescer em meio de cultura com pH inicial = 5,0, por outro lado nenhuma cepa acidofilica foi capaz de crescer em meio de cultura com pH= 6,6.

Conforme descrito por GARCIA Jr(1989), *T.ferrooxidans* é inibido por compostos orgânicos como o agar, necessitando de meio sólido preparado com agarose. Possivelmente

por esse motivo as cepas acidofílicas A10Tf e A10Tf, capazes de oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$ , em meio 9K- $\text{Fe}^{2+}$ , não cresceram em meio sólido S5.

#### 4.4.2.3. Meio de Postgate modificado para *T.thioparus*

As cepas neutrofílicas isoladas da areia de Jacareí e do lodo da ETA do Riacho Grande apresentaram uma capacidade maior de produção de ácido do que as cepas neutrofílicas isoladas do concreto deteriorado do reservatório de água do Instituto Butantan, quando incubadas em meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus*. A Tabela 19 mostra as diferenças de pH final produzido por várias cepas neste meio líquido (pH inicial de 7,4) após 14 dias de incubação a  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Tabela 19 pH do meio de Postgate modificado para *T.thioparus* decorrente do metabolismo de cepas neutrofílicas de diferentes procedências

Cepa	Amostra de origem	pH final
C1p	Eflorescência (concreto / Instituto Butantan)	5,9
C2Ar	Concreto com armadura exposta (concreto / Instituto Butantan)	5,9
C4RG	Lodo (ETA do Riacho Grande)	4,3
A6Tp	Areia (coletada no IPEN / Jacareí)	3,7

#### 4.4.2.4. Meio de Postgate modificado para *T. thiooxidans*

As cepas acidofílicas isoladas das amostras de areia de Biritiba Mirim e de Itaquaquecetuba, também mostram diferença na produção de ácido quando cultivadas em meio de Postgate modificado para *T.thiooxidans* com pH inicial de 4,5 (20 dias de incubação a  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ ), como mostra a Tabela 20 .

Tabela 20 : Valor do pH final em meio líquido de Postgate modificado para *T.thiooxidans* após a incubação com algumas cepas acidofílicas

Cepa	Amostra	pH final
A10Th	Arenito cimentado por sulfetos - (Itaquaquecetuba)	1,7
A9Th	Areia para construção civil (Itaquaquecetuba)	1,0
A2Th	Areia bruta coletada no Setor de areias do IPT (Biritiba Mirim)	2,7

#### 4.4.2.5. Meio ATCC 238 e meio ATCC 238 adaptado para *T.thioparus* em comparação com os meios de Postgate modificados para *T.thiooxidans* e *T.thioparus*

Para observar a variação do pH no meio de cultura líquido das cepas acidofílicas A10Th e A9Th, observou-se o crescimento destas cepas, em função do tempo, em dois meios de cultura diferentes: o meio ATCC 238, contendo 1% de enxofre elementar e o meio de Postgate modificado para *T.thiooxidans*, com 1% de tiosulfato. Após 14 dias de incubação, o pH em meio ATCC 238 chegou a 0,4 e no meio de Postgate modificado p/ *T.thiooxidans* chegou a 1,7

Para observar a variação de pH da cepa neutrofílica A6Tp em dois meios diferentes, inoculou-se esta cepa em meio ATCC 238 adaptado com 0,5 % de tiosulfato (pH inicial= 7,5) e em meio de Postgate modificado para *T.thioparus*. Após 14 dias de incubação o pH no meio ATCC 238 chegou a 4,1 e o pH no segundo meio chegou a 3,8.

A Figura 28(a) apresenta os valores de pH do meio líquido ATCC 238 contendo 1% de S<sup>0</sup> para as cepas acidofílicas A10Th e A9Th (pH inicial =4,5) e 0,5% de tiosulfato de sódio (pH inicial = 7,4) para a cepa A6Tp.

A Figura 28(b) apresenta os valores de pH do meio líquido de Postgate modificado para *T.thiooxidans* (pH inicial= 4,5) para a cepa A10Th, e meio líquido de postgate modificado para *T.thioparus* ( pH inicial 7,4) para a cepa A6Tp.

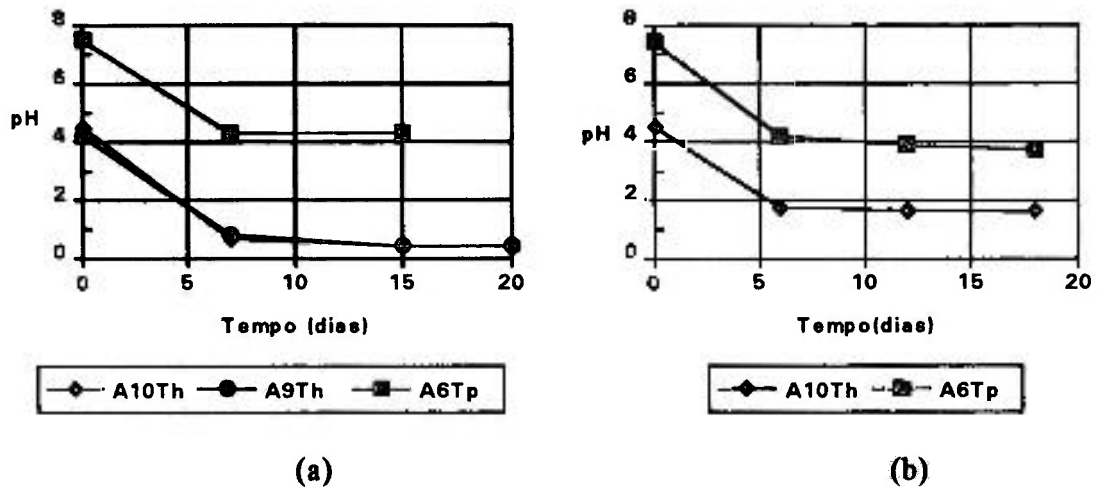


Figura 28(a): Variação do pH do meio de cultura líquido ATCC 238 contendo 1% S<sup>0</sup> para as cepas acidofílicas e 0,5 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para a cepa AsuJ

Figura 28(b): Variação do meio líquido de Postgate modificado para *T.thiooxidans* para a cepa A10Th e meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus* para a cepa A6Tp

#### 4.4.2.6. Discussão dos resultados

Estes resultados confirmaram os dados da literatura<sup>(35, 43)</sup>, de que os *Thiobacillus* crescem em faixas definidas de pH. As cepas neutrofilicas iniciaram o crescimento em pH próximo a 7,0 e atingiram pH final entre 6,0 e 3,8. As cepas acidofílicas iniciaram o crescimento com pH próximo a 5,0 e atingiram pH final entre 2,0 e 0,5.

Os resultados evidenciam que as cepas acidofílicas, procedentes de Itaquaquecetuba, não sobrevivem ao pH elevado equivalente ao que ocorre nos poros do concreto.

As cepas neutrofilicas, isoladas da areia procedente de Jacareí, não conseguiram sobreviver por um período prolongado (cerca de 30 dias à temperatura ambiente) nos meios líquidos testados. A literatura registra que algumas espécies de *T.thioparus* são sensíveis ao pH ácido, e concluiu-se que estas cepas isoladas, não sobreviveram por causa do pH atingido no meio de cultura.

#### 4.4.3. Resultados da curva de crescimento para observar a concentração de bactérias no inóculo para os testes de identificação

Visto que estas bactérias isoladas mostraram ser de crescimento lento, este ensaio foi realizado para observar se o inóculo, para os testes de identificação, teria quantidade

significativa de bactérias no terceiro dia de incubação em meio S6/S5, como é proposto por HUTCHINSON e colaboradores (53) , A Tabela 21 mostra a concentração celular em função do tempo de incubação, em meio de cultura líquido S6 para as cepas neutrofilicas e meio líquido S5 para uma cepa acidofílica.

**Tabela 21 : Concentração bacteriana em função do tempo de incubação, em meio líquido S6 para as cepas neutrofilicas e meio líquido S5 para uma cepa acidofílica.**

<b>Tempo de incubação (Dias)</b>	<b>C2Ar Meio S6 (UFC/mL)</b>	<b>C1p Meio S6 (UFC/mL)</b>	<b>C1m Meio S6 (UFC/mL)</b>	<b>C4RG Meio S6 (UFC/mL)</b>	<b>A10Th Meio S5 (UFC/mL)</b>
contagem inicial	$5,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$
1	$2,5 \times 10^5$	-	$1,6 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
2	$1,1 \times 10^5$	-	$1,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$
3	$1,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$7,9 \times 10^7$
5	$6,5 \times 10^8$	-	-	$6,1 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$
6	$6,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^9$	$9,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,9 \times 10^9$
7	$5,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	-

A Figura 29 apresenta as curvas de crescimento, em função do tempo de incubação para as cepas C2Ar, C4RG, C1m e A1Th.

#### 4.4.3.1. Discussão dos resultados

Os valores obtidos permitiram certificar-se de que no terceiro dia de incubação, as cepas testadas apresentavam entre  $10^7$  e  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro, portanto garantindo um inóculo adequado para se efetuarem os testes preliminares de identificação.

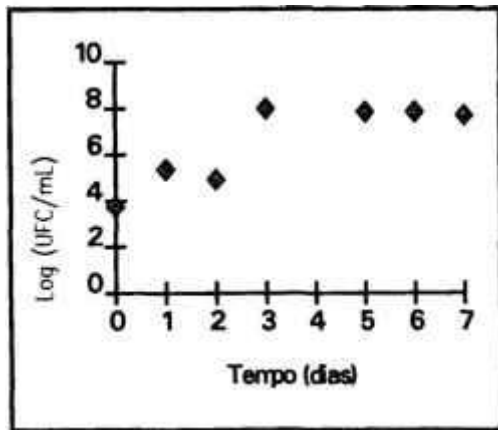


Figura 29(a)

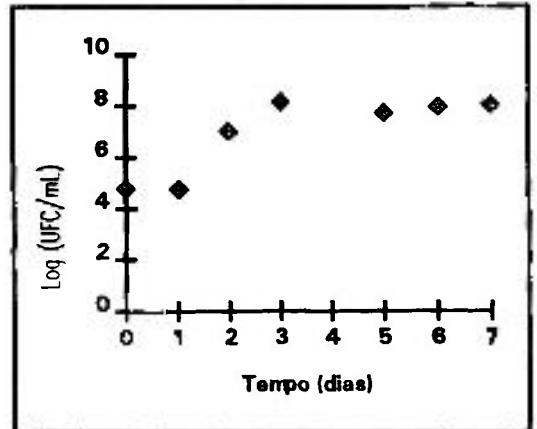


Figura 29(b)

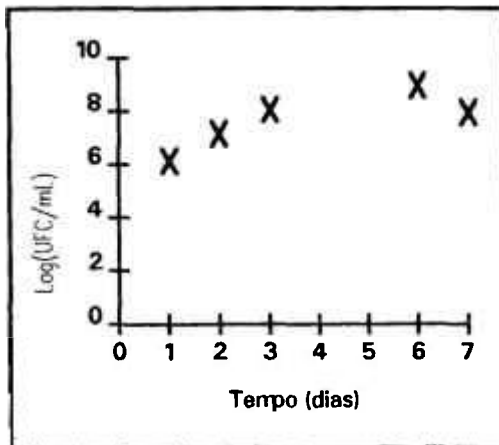


Figura 29(c)

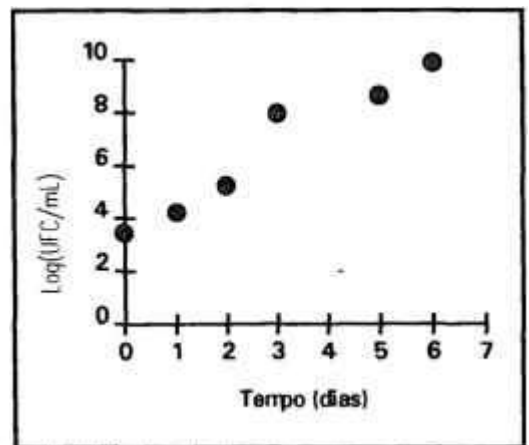


Figura 29(d)

Figura 29(a) : Curva de crescimento da cepa C2Ar em meio líquido S6

Figura 29(b) : Curva de crescimento da cepa C4 RG em meio líquido S6

Figura 29(c) : Curva de crescimento da cepa C1m em meio líquido S6

Figura 29(d) : Curva de crescimento da cepa A10Th em meio líquido S5

#### 4.4.4. Resultado dos testes preliminares para identificação de *Thiobacillus*

Os resultados dos testes preliminares para a identificação das cepas isoladas são apresentados na Tabela 22 .

Entre as cepas acidofílicas testadas nenhuma delas foi capaz de crescer em agar nutriente, portanto todas apresentaram-se autotróficas obrigatórias. Duas destas cepas exibiram capacidade de oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  em meio 9K- $\text{Fe}^{2+}$ . Apenas a cepa A10Tf mostrou capacidade de oxidação do tiosulfato em meio S5 de 98 % e diminuição do pH nos meios contendo enxofre e tiosulfato para abaixo de 2,0. Esta cepa mostrou características típicas de *T. ferrooxidans*. A cepa A2 Tf apresentou apenas 10 % de oxidação do tiosulfato no meio S5, o pH neste meio chegou a 3,95. Apenas em meio contendo enxofre o pH final chegou a 1,85. Estes resultados evidenciaram que esta cepa não apresentou as características típicas para *T. ferrooxidans*, merecendo portanto, investigações posteriores para a identificação da espécie.

As cepas acidofílicas A10Th e A9Th apresentaram 99% de oxidação do tiosulfato em meio S5; o pH final neste meio chegou a zero para as duas cepas, em meio contendo enxofre a cepa A10Th atingiu pH = 1,50 e a cepa A9Th atingiu pH 1,20. No meio S0 contendo 6% de tiosulfato a cepa A10Th alcançou 46% de oxidação do tiosulfato e a cepa A9Th alcançou 60%. Estes resultados apresentaram características típicas para *T. thiooxidans*.

A cepa acidofílica A2Th apresentou 9% de oxidação do tiosulfato em meio S5, e pH final neste meio de 4,20. Em meio contendo enxofre o pH final foi de 4,43; estes dados são incompatíveis com a espécie *T. thiooxidans*. Para a identificação desta cepa outros ensaios complementares devem ser efetuados.

Entre as cinco cepas neutrofílicas testadas, a única cepa que não cresceu em agar nutriente apresentando portanto característica autotrófica obrigatória foi a cepa C4RG. Esta cepa apresentou 99% de oxidação do tiosulfato em meio S6 e pH final deste meio = 4,6. Em meio contendo enxofre o pH final chegou a 4,00. Esta cepa foi capaz de crescer em meio sólido S8 em condições de anaerobiose, mas não foi capaz de desnitrificar em meio S8 líquido nestas condições. Estes resultados mostraram características típicas de *T. thioparus*.

As cepas neutrofílicas C1p, C1e, C1m e C2Ar apresentaram características autotróficas facultativas. Todas elas cresceram autotroficamente em meio S6 e heterotroficamente em agar nutriente. Em meio S6 estas cepas apresentaram oxidação do

tiosulfato inferior a 10% da concentração inicial e pH final próximo a 7,0; o pH final em meio contendo enxofre ficou próximo a 6,4. Estas cepas conseguiram crescer em meio sólido S8 em condições anaeróbias, porém não apresentaram desnitrificação em meio líquido S8 nestas condições. As cepas C2Ar e C1p não cresceram em meio contendo citrato como fonte de carbono, enquanto as cepas C1m e C1e cresceram neste meio.

Estas cepas neutrofilicas autotróficas facultativas apresentaram resultados anômalos e sua classificação, mesmo a nível de grupo, ficou prejudicada. Considerando-se a utilização de citrato como um critério divisor, pode-se situar as cepas neutrofilicas C2AR e C1p como pertencentes ao grupo 0 e as cepas neutrofilicas C1m e C1e como pertencentes ao grupo 1a. No entanto, algumas questões discutidas a seguir levantam algumas dúvidas quanto a essa classificação.

#### 4.4.4.1. Discussão dos resultados dos testes preliminares de identificação

Os resultados das cepas acidofilicas A10Th e A9Th permitem evidenciar que estas linhagens pertencem à espécie *T. thiooxidans*, sem dar margem a dúvidas. No entanto, a cepa acidofilica A2Th apresenta resultados de pH final anômalos em meio S5 e em meio S0 com enxofre elementar. Em meio líquido de Postgate modificado para *T. thiooxidans* esta cepa apresenta pH final = 2,7, indicando que neste meio o tiosulfato é consumido com produção de ácido. E em meio S5, o tiosulfato é consumido sem produção significativa de ácido. É interessante registrar que as cepas A10Th e A9Th foram obtidas por enriquecimento em meio líquido 9K-S<sup>0</sup> e a cepa A2Th foi obtida por enriquecimento em meio líquido de Postgate modificado para *T. thiooxidans*.

A cepa acifofilica A10Tf apresentou características fisiológicas que permitem classificá-la como pertencente a espécie *T. ferrooxidans*. O mesmo não ocorrendo com a cepa A2Tf que não apresentou porcentagem de oxidação do tiosulfato e pH final compatíveis com a espécie em meio líquido S5.

A cepa neutrofilica C4RG apresentou características clássicas que permitiram identificá-la como pertencente à espécie *T. thioparus*.

As cepas autotróficas facultativas C1m, C1e, C1p e C2Ar foram obtidas por enriquecimento em meio líquido de Postgate modificado para *T. thioparus*, com o posterior isolamento no mesmo meio sólido, nas mesmas condições que a cepa C4RG. É possível garantir que as cepas não pertencem a espécie *T. thioparus*, pois crescem heterotroficamente em agar nutriente.

Quando as cepas C2Ar, C1p, C1m e C1e foram cultivadas em meio líquido S6, (com pH inicial = 6,6), observou-se um ligeiro aumento do pH no meio (6,0 a 7,0), enquanto que em meio líquido de Postgate modificado para *T. thioparus* (com pH inicial = 7,4) estas cepas cresceram acidificando o meio até pH final 6,0. Embora estes dois meios tenham uma composição muito parecida, nos seus componentes principais, eles apresentam algumas diferenças: o pH inicial de cada meio, a concentração inicial de tiosulfato e a solução traços de elementos, que é adicionada somente no meio de Postgate modificado para *T. thioparus*. Um destes fatores, ou o conjunto deles, devem possivelmente contribuir para uma via metabólica diferente quando as mesmas cepas são inoculadas nestes meios.

De qualquer maneira, vale observar que tanto em meio S6 quanto em meio de Postgate modificado para *T. thioparus*, as cepas C1p, C1e, C1m e C2Ar apresentam comportamento quimiolitotrófico e autotrófico.

A baixa porcentagem de oxidação do tiosulfato no meio S6 levanta as seguintes questões: é possível uma cultura atingir cerca de  $10^8$  células em três dias de incubação, e manter esta concentração celular por um período de 7 dias (curva de crescimento pag. 89), à custa apenas desta baixa concentração de tiosulfato oxidado? Haveria nesta condição, a formação de alguns politionatos (tritionatos ou pentationatos) que por decomposição poderiam regenerar o tiosulfato e, desta forma, manter elevada a sua concentração? Haveria um sistema enzimático que reduzisse os politionatos eventualmente formados e recuperasse o tiosulfato? Todas estas questões levantadas merecem atenção em estudos futuros para auxiliar a identificação destas cepas autotróficas facultativas.

TRUNDIGER<sup>(85)</sup> observou que algumas bactérias heterotróficas isoladas do solo, que oxidam tiosulfato, possuem um sistema enzimático capaz de oxidar o tiosulfato a tetracionato em aerobiose e reduzir o tetracionato a tiosulfato em anaerobiose, de forma que estes compostos se mantêm cíclicos em um processo de oxi-redução. A questão mais intrigante é que este processo não gera energia para esses microorganismos. Este dado mostra a complexidade metabólica nos processos de oxidação de compostos inorgânicos reduzidos de enxofre por microorganismos heterotróficos.

HUTCHINSON e colaboradores<sup>(35)</sup>, consideravam, em 1969, como representante do grupo 0 a espécie então designada "*T. trautweinii*", que se movimenta por flagelos peritriquéos. As bactérias móveis do gênero *Thiobacillus* movimentam-se por um ou mais flagelos polares, e esta é uma característica morfológica típica deste gênero. Atualmente as bactérias do grupo 0 não são consideradas como pertencentes ao gênero *Thiobacillus*<sup>(43)</sup>. Portanto as cepas C1p e C2Ar podem não pertencer ao gênero *Thiobacillus*.

As espécies pertencentes ao grupo 1a são apresentadas como sendo provavelmente linhagens de *T. versutus* segundo a classificação mais recente de KELLY & HARRISON<sup>(43)</sup>. As colônias isoladas desta espécie crescem em ágar com aparência de "ovo frito". Esta característica pode ser observada na Figura 25 que apresenta colônias da cepa C1m crescendo sobre o meio sólido S6. Esta característica é mais um indício de que as cepas C1m e C1e (que também possui esta mesma característica) pertencem ao grupo 1a. No entanto, o valor do pH final em meio S6 líquido apresentou-se acima do esperado para este grupo. Por estes motivos, devem ser realizados testes complementares para classificar estas cepas neutrofilicas autotróficas facultativas isoladas neste trabalho.

É interessante observar que embora por questões relacionadas à taxonomia do gênero *Thiobacillus* as bactérias do grupo 0 encontrem-se atualmente excluídas deste gênero, algumas destas linhagens até então designadas como "*T. trautweinii*" foram encontradas no concreto do esgoto de Melbourne na Austrália<sup>(59)</sup> como sendo parte integrante da microbiota daquele concreto.

Segundo KUENEN & BEUDEKER<sup>(46)</sup> as bactérias sulfoxidantes autotróficas facultativas possuem uma vantagem adaptativa sobre as bactérias autotróficas obrigatórias do gênero *Thiobacillus*, pois a sua flexibilidade metabólica favorece o seu crescimento em ambientes sujeitos a mudança constante devido à colonização de populações diferentes de microrganismos.

A partir dos resultados obtidos e dados da literatura<sup>(35)</sup> elaborou-se um esquema que apresenta uma classificação a nível de grupos, utilizando-se os seguintes critérios : pH final em meio S6/S5, formação de gás em meio S8, crescimento em ágar nutriente, meio contendo somente citrato como fonte de energia e prova de motilidade em gota pendente.

A Figura 30 apresenta a seqüência de testes para uma classificação aproximada a nível de grupo.

Tabela 22 : Resultados dos testes preliminares para identificação de *Thiobacillus*

Meio de cultura	Critériode avaliação	Cepas neutrofilicas						Cepas acidofilicas					
		Controle	C2Ar	C1p	C1m	C1e	C4 RG	Controle	A10Th	A9Th	A6Th	A10Tf	A6Tf
S6 /S6	pH final	6,60	6,90	6,95	7,00	6,95	4,6	4,90	0,00	0,00	4,20	0,80	3,95
S6 /S5	Oxidação de tiosulfato (%)	0	1	6	2	5	99	0	99	99	9	98	10
SO + 6% tiosulfato	Oxidação de tiosulfato (%)	0	0	8	0	0	0	0	46	60	0	0	1
S6 / S5 + 4% fosfato	Inibição	S/A	-	-	-	-	-	S/A	-	-	-	-	-
S6/ S5 + 5% NaCl	Inibição	S/A	+	+	+	+	+	S/A	+	+	+	+	+
Enxofre	pH final	6,40	6,40	6,44	6,40	6,44-	4,00	4,50	1,50-	1,20-	4,43-	1,33-	1,85-
S8 (anaerobiose)	Crescimento	S/A	+	+	+	+	+	S/A	-	-	-	+	+
Anaerobiose	Formação de gás	S/A	-	-	-	-	-	S/A	-	-	-	-	-
S7	Crescimento em tiocianato	S/A	-	-	-	+	-	S/A	-	-	-	-	-
9K	Oxidação de Fe <sup>2+</sup>	S/A	-	-	-	-	-	S/A	-	-	-	+	+
Agar nutriente	Crescimento	S/A	+	+	+	+	-	S/A	-	-	-	-	-
Citrato	Crescimento	S/A	-	-	+	+	-	S/A	-	-	-	-	-
Agar tiosulfato	Deposição de S <sup>0</sup>	S/A	-	-	-	-	+	S/A	+	+	+	-	-

(+) = positivo para os testes de crescimento; e inibição para os testes com NaCl e fosfato;

(-) = negativo para os testes de crescimento; e ausência de inibição para os testes com NaCl e fosfato;

(S/A) = Sem alteração no meio controle não inoculado; e

A procedência da amostra e as características das cepas analisadas estão apresentadas na Tabela 17.

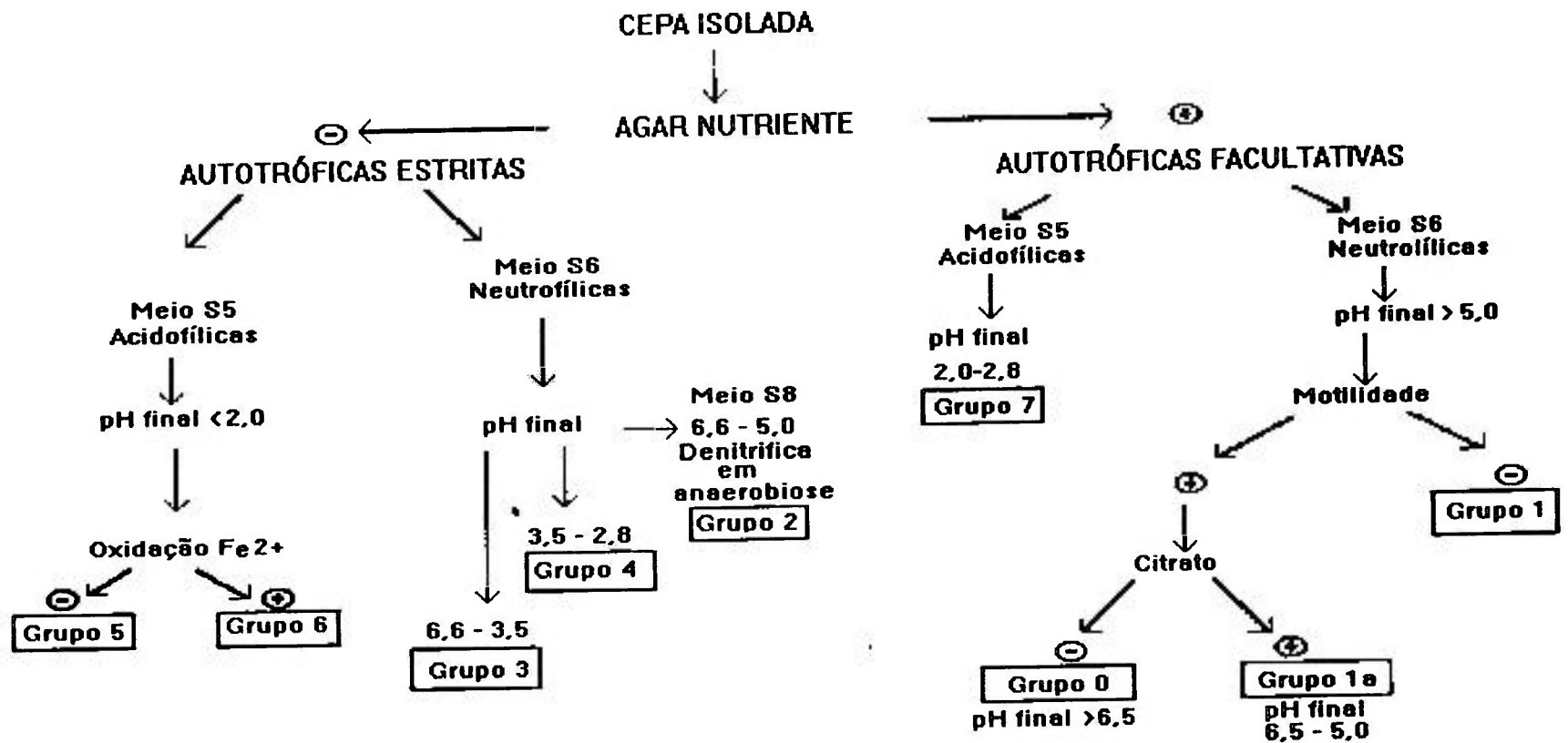


Figura 30: Esquema para classificação de *Thiobacillus* em grupos

#### 4.5. Resultados dos testes qualitativos de crescimento de cepas isoladas em meio de cultura elaborados com suspensões de materiais de construção.

Estes testes foram idealizados com o objetivo de observar-se a possibilidade da escória granulada de alto-forno (adicionada ao cimento Portland de alto-forno, cimento Portland composto e cimento Portland comum) ser utilizada como substrato por cepas de bactérias isoladas do concreto

A composição química da escória utilizada como substrato neste meio sólido encontra-se na Tabela 10. Todos os elementos químicos necessários a um meio mineral, como por exemplo o meio S6, são encontrados na escória granulada de alto-forno.

Por considerar que também seria interessante observar a possibilidade destas cepas crescerem somente com os componentes da matriz do concreto exposto ao ambiente, idealizou-se um teste com um meio de cultura de argamassa triturada já exposta ao meio ambiente. Neste caso, o meio foi preparado com a matriz analisada em estudo-de-caso. A Tabela 23 sumariza os resultados obtidos para as cepas C2Ar e C4RG.

Tabela 23 : Teste de crescimento das cepas C2Ar e C4RG em meio de cultura sólido de escória granulada de alto-forno e meio de argamassa triturada

Origem da cepa	Cepa	Meio sólido	
		escória	argamassa
Concreto com armadura exposta (reservatório de água- Inst. Butantan)	C2Ar	+	+
Lodo aderido ao concreto (E.T.A.-Riacho Grande)	C4RG	-	-

( + ) = teste positivo

( - ) = teste negativo

Obs: os testes foram realizados em triplicata e apresentaram resultados idênticos

A Figura 31 mostra a cepa C2Ar crescendo sobre o meio sólido de uma suspensão de escória granulada de alto-forno (COSIPA).

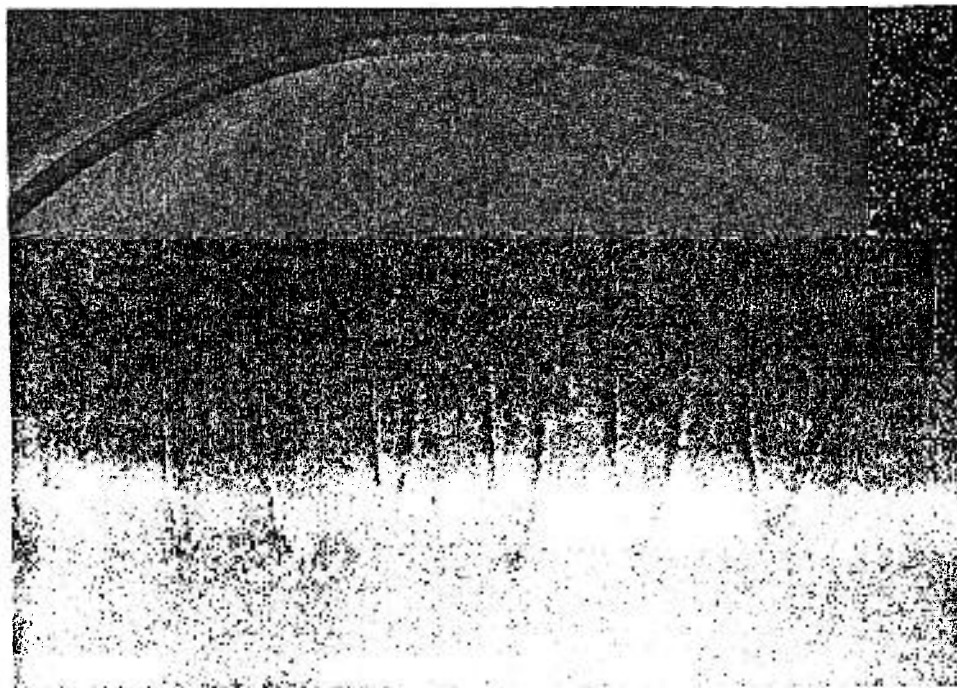


Figura 31 : Crescimento em estria da cepa C2Ar sobre o meio de escória granulada de alto-forno (COSIPA) - Ampliação ~2 x.

#### 4.5.1. Discussão dos resultados dos testes de crescimento em meios elaborados com suspensões de materiais de construção

Os resultados obtidos neste teste de crescimento, em meios sólidos elaborados com suspensão de materiais de construção, permitem levantar a hipótese de que os nutrientes necessários à sobrevivência da cepa C2Ar, autotrófica facultativa isolada do concreto, podem estar contidos nos próprios materiais de construção. No entanto, é necessário que sejam realizados estudos mais detalhados envolvendo análise química quantitativa que permita detectar a transformação de cada substância, para investigar quais os nutrientes consumidos e quais os produtos formados.

Várias tentativas foram efetuadas para observar o crescimento das cepas A10Th e A10Tf em meios líquidos contendo escória granulada de alto-forno, porém não foi possível a obtenção de dados significativos.

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Constatado o fato de que as areias analisadas permitem o crescimento de *Thiobacillus*, seria conveniente investigar, em estudos posteriores, se cepas neutrofilicas produtoras de ácido sulfúrico, e por isso importantes no processo de biodeterioração do concreto, podem crescer em um concreto produzido com as areias de onde foram isoladas as cepas.

Uma maneira de investigar esta possibilidade é introduzir quantidades elevadas de *Thiobacillus* ( $10^{13}$  células/mL) na água de amassamento de um corpo de prova produzido com as areias e cimentos a serem empregados. Sugere-se também efetuar experimentos em temperaturas de incubação diferentes, dentro da faixa de variação climática brasileira. A ruptura periódica de alguns corpos de prova, com a aplicação da técnica dos tubos múltiplos para o NMP de *Thiobacillus* pode mostrar a flutuação da concentração de *Thiobacillus*, ao longo do tempo.

- Para investigar se linhagens de espécies diferentes do gênero *Thiobacillus* podem utilizar o sulfeto de cálcio como fonte de energia, alguns experimentos podem ser efetuados:

O primeiro passo é observar se o sulfeto de cálcio, na forma de reagente p.a., pode ser oxidado em meio de cultura, em condições ótimas de temperatura e aeração. É importante quantificar todos os possíveis compostos intermediários que venham a ser formados durante a oxidação bacteriana.

Caso este primeiro ensaio seja positivo, uma grande variedade de testes com a escória granulada de alto-forno, e com cimentos com adição de escória devem ser efetuados. Quando os testes forem realizados com corpos de prova, duas situações podem ser observadas: com as bactérias inoculadas na água de amassamento, no interior do concreto, e, com as bactérias inoculadas na água de cura, ou seja na parte externa do concreto.

O acompanhamento destes testes podem ser efetuados com análise microbiológica periódica, análise química e difração de raios X, para observar possível formação de compostos expansivos, como por exemplo, a etringita, a taumasita e a gipsita.

- A investigação de *Thiobacillus denitrificans* e de bactérias redutoras de sulfato em amostras de solo e concreto são de grande importância para a compreensão do fenômeno de biodeterioração do concreto em condições anaeróbias e também da biocorrosão das armaduras de concreto.
- Outra questão a ser investigada, é a resistência das bactérias isoladas a diferentes doses de radiação ionizante.
- Sugere-se investigar o uso de biocidas na prevenção da biodeterioração do concreto, enfocando-se a questão da influência destes compostos no impacto ambiental das áreas adjacentes ao repositório final para rejeitos radioativos e a interferência de biocidas na qualidade do concreto.
- Quando alguns locais candidatos estiverem estabelecidos para a instalação de repositório final de rejeitos radioativos, sugere-se que sejam efetuadas investigações sobre a microbiota destes locais. Um local cujo solo apresente menor concentração de *Thiobacillus* e bactérias redutoras de sulfato, oferece menor risco potencial de ataque microbiológico.

No caso da concentração destes microrganismos ser equívante nos solos dos locais candidatos, sugere-se que sejam efetuados estudos acelerados que envolvam a microbiota local, o solo e os materiais de construção a serem empregados. Espera-se que estes estudos possam prever uma composição de materiais de construção com menor potencial de ataque microbiológico local.

A Figura 32 mostra um plano de trabalho para um estudo desta natureza.

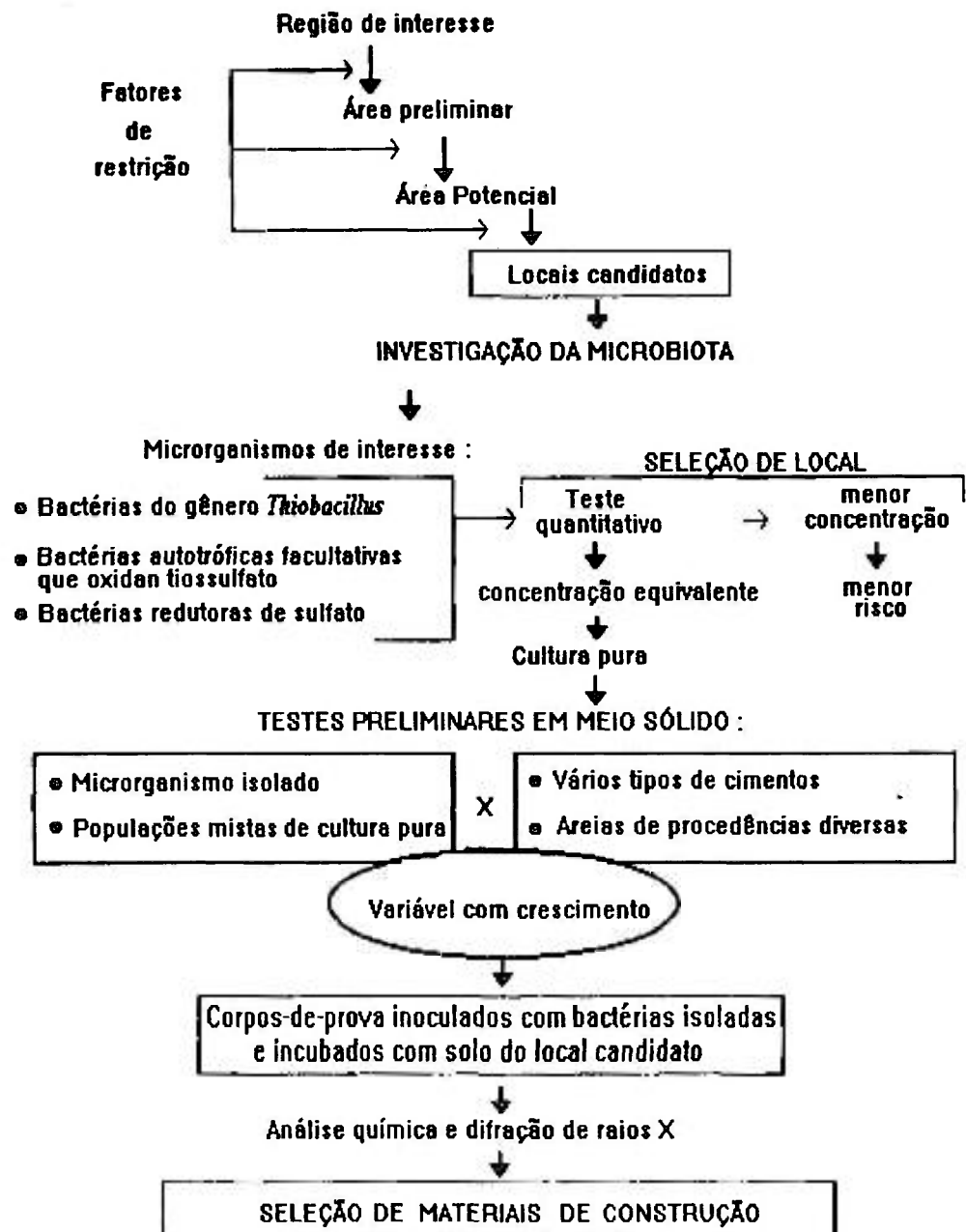


Figura 32 : Plano de trabalho para estudo da biodeterioração do concreto envolvendo seleção de local e seleção de materiais de construção para repositório final.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### *Quanto aos resultados deste trabalho concluiu-se que:*

- A ocorrência de bactérias do gênero *Thiobacillus* em amostras de areia para construção civil e amostras de concretos expostos ao ambiente, é uma questão que ressalva a necessidade de se considerar o fator biológico interferindo na durabilidade do concreto.
- Para pesquisa qualitativa de *Thiobacillus* é possível utilizar a areia diretamente como inóculo no meio de cultura líquido. No entanto, não é aconselhável a utilização do concreto diretamente como inóculo, pois o hidróxido de cálcio sofre dissolução e alcaliniza o meio líquido de cultura, mascarando a viragem do indicador ácido-base.
- Os meios minerais utilizados para os testes presuntivos, enriquecimento e isolamento de *Thiobacillus*, embora seletivos para uma determinada espécie em questão, permitem o crescimento de outras linhagens não pertencentes à espécie.
- Algumas cepas autotróficas obrigatórias foram identificadas por possuírem algumas características fisiológicas clássicas. Desta forma, identificaram-se duas cepas de *T.thiooxidans*, uma cepa de *T.ferrooxidans* e uma cepa de *T.thioparus*. Por outro lado, as cepas autotróficas facultativas móveis apresentaram características fisiológicas que dificultaram o processo de identificação preliminar.
- As cepas de *T. thiooxidans* isoladas da areia de Itaquaquetuba, embora sejam potencialmente as mais agressivas ao concreto por sua capacidade de produção de ácido, são inibidas em pH inicial = 12 no meio de cultura. Este fato indica que estas cepas devem ser inibidas pelo pH elevado da água do poro do concreto
- O teste de crescimento em meio de cultura sólido elaborado com suspensão de materiais de construção pode ser utilizado como um teste inicial de triagem envolvendo variedade ampla de materiais de construção e microrganismos de interesse.

Vários aspectos observados a partir dos resultados obtidos, possibilitam traçar um perfil geral a respeito da biodeterioração do concreto no que se refere às possíveis condições de um repositório final de superfície para rejeitos radioativos a ser construído no Brasil:

#### ***Quanto seleção de locais para a instalação de um repositório final :***

Apesar da amostragem ter sido aleatória, a ocorrência de *Thiobacillus* foi significativa nos materiais de construção analisados. Por ser este o gênero de bactérias mais agressivo ao concreto pela produção de ácido sulfúrico, é recomendável efetuar-se análise microbiológica do solo nos locais candidatos à instalação de repositório final para rejeitos radioativos. Este procedimento pode servir como um parâmetro para auxiliar na seleção um local com menor potencial de ataque microbilógico ambiental, e orientar a seleção de materiais de construção.

#### ***Quanto questão da carbonatação do concreto:***

Ao se efetuar um paralelo com duas amostras de eflorescência dos concretos estudados, nas quais os testes presuntivos indicaram presença de *Thiobacillus*, constatou-se que ambas apresentaram estalactites em regiões onde ocorria vazamento de água. O vazamento de água favorece a lixiviação da portlandita e faz com que esta ao tomar contato com a atmosfera contendo dióxido de carbono, seja carbonatada, reduzindo o pH da superfície do concreto, o que provavelmente favorece a colonização inicial de cepas neutrofilicas do meio ambiente para o concreto.

Segundo HODGKINSON<sup>(32)</sup>, dentro do repositório, pode ocorrer a formação de dióxido de carbono como produto do metabolismo de alguns microrganismos sobre os compostos orgânicos depositados como rejeitos. O dióxido de carbono tende a ser difundido no concreto, carbonatando-o, caso isso ocorra, criam-se condições mais favoráveis para a colonização de microrganismos na face interna do repositório. Portanto, a ocorrência desse fenômeno é também um parâmetro importante a ser considerado na prevenção da biodeterioração do concreto. A proteção da face interna com uma resina protetora pode ser adotada como uma medida preventiva.

### ***Quanto seleção dos materiais de construção:***

Os testes qualitativos de crescimento sobre os meios de cultura sólidos, contendo suspensões de materiais de construção, indicam que a cepa C2Ar pode obter seus nutrientes a partir destes materiais.

É preciso esclarecer se os materiais de construção podem fornecer nutrientes que venham a ser transformados em produtos agressivos pelos microrganismos integrantes da microbiota superficial do concreto.

Atualmente as escórias granuladas de alto-forno são adicionadas aos cimentos Portland de alto-forno, cimento Portland composto e cimento Portland comum. A escória apresenta cerca de 1% de sulfeto de cálcio. Por se tratar de um composto inorgânico de enxofre reduzido, esta substância é potencialmente oxidável por bactérias do gênero *Thiobacillus* neutrofilicas como sugerido por WAKSMAN & JOFFE<sup>(91)</sup>.

Por uma questão preventiva de biodeterioração do concreto, até que se confirme a impossibilidade de cepas *Thiobacillus* oxidarem este sulfeto, estes tipos de cimento não devem ser recomendados para a construção de repositórios finais para rejeitos radioativos.

Entre as causas reconhecidamente geradoras de patologias do concreto, a influência dos microrganismos como agente patogênico, nas obras da engenharia civil, não têm sido estudada, excetuando-se os tubos de esgoto. Sugere-se que futuramente os estudos sejam mais amplos, incluindo este parâmetro. A multidisciplinaridade na ciência, é, também neste caso, benéfica ao conhecimento e aprofundamento do assunto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLSOPP, D. & KENNETH J. S. *Introduction to Biodeterioration*. London, Edward Arnold, 1986.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Areia normal para ensaio de cimento*. São Paulo, 1977. (NBR 7214/82)
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Análise química de cimento Portland - Determinação com dicromato de potássio*. São Paulo, 1977. (NBR 5742/77).
4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Análise química de cimento Portland - Determinação de resíduo insolúvel*. São Paulo, 1977. (NBR 5744/89)
5. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Cimento Portland comum*. São Paulo, 1991. (EB-1/91)
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Cimento Portland composto*. São Paulo, 1991. (EB-2138/91)
7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Cimento Portland de alto-forno*. São Paulo, 1991. (EB-208)
8. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Cimento Portland pozolânico, cimento Portland comum e cimento Portland composto com adições de materiais pozolânicos - Análise química - Método de referência. Método de ensaio*. São Paulo, 1991. (NBR 8347/91)
9. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Cimento Portland - Determinação de anidrido sulfúrico. Método de ensaio*. São paulo, 1989. (NBR 5745/89)
10. ATÊNCIO, D. & HYPÓLITO, R. Soluções de intemperismo natural e simulado de sulfetos de Itaquaquetuba- São Paulo. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **60** (3) : 305-319, 1988.
11. ATLAS, R. M. *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Philippines, Addison-Wesley, 1981.

12. BICZOK, I. *La corrosión del hormigón y su protección*. Bilbao (España), Urbitarte, 1972.
13. BORZANI, W. Corrosão por microrganismos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; ALMEIDA LIMA U.DE. *Biotecnologia- Tópicos de microbiologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher, 1975.
14. BUCKLEY, L. P.; PHILIPSE, K. E; TOROK, J. Engineered barriers and their influence on source behavior. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Management of Low and Intermediate Level Radioactive Wastes: proceedings of international symposium on...held in Stockholm, May 16-20 1988*. Vienna, 1989. p.147-161 (IAEA-SM-303/120)
15. CALMET, D. P.. Ocean disposal of radioactive waste: Status report. *Int. At. Energy Agency Bull.*, 4 : 47-50, 1989.
16. COLASANTI, R.; COUTTS, D.; PUGH, S.Y.R. AND ROSEVEAR, A.. Microbiology radioactive waste disposal; review of the NIREX research program, January 1989. Harwell (UK), United Kingdom Nirex, Ltd., Mar 1990. (NSS/R131)
17. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. *Gerência de rejeitos radioativos em instalações radiativas*. Rio de Janeiro, 1985. (CNEN-NE-6.05)
18. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. *Seleção e escolha de locais para depósitos de rejeitos radioativos*. Rio de Janeiro, 1989. (CNEN-NE-6.06)
19. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. *Licenciamento de instalações radiativas*. Rio de Janeiro, 1984. (CNEN-NE-6.02)
20. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Determinação do N.M.P. de Bactérias Redutoras de Sulfato (Desulfovíbrio) pela Técnica dos Tubos Múltiplos*. São Paulo, 1989. (L5.210)
21. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Thiobacillus - Determinação do Número Mais Provável pela Técnica dos Tubos Múltiplos*. São Paulo, 1991. (L5.217)
22. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Bactérias Heterotróficas - Contagem em placas*. São Paulo, 1986 (L5.201)

23. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Isolamento e Contagem de fungos em Águas, Esgotos e Resíduos sólidos*. São Paulo, 1988. (L5.204)
24. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Método semi-automático para determinação de Nitrogênio KJEDAHN Total em água*. São Paulo, 1982. (Relatório nº 034/82/GAG)
25. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. *Método semi-automático para determinação de Fósforo Total, Inorgânico, Orgânico e Fosfato Ácido Hidrolizável em água*. São Paulo, 1981. (033/GAG)
26. DROZD, G.Ya. Activity of microorganisms in pores of concrete. *Appl. Biochem. Microbiol.* ,22 (6): 697-701, 1986.
27. EMMEL, T.; BRILL, H.; SAND, W. AND BOCK, E. Screening for biocides to inhibit biogenic sulfuric acid corrosion in sewage pipelines. In: HOUGHTON, D.R.; SMITH, R.N.; EGGINS, H.O.W. eds. *Biodeterioration 7: selected papers present at the seventh International Symposium, held in Cambridge, Set. 6-11, 1987*. London, Elsevier, s.d. p.118-22.
28. FORD, T. & MITCHELL, R. The ecology of Microbial Corrosion. *Adv. Microb. Ecol.* ,11: 231-263, 1990.
29. FRANZEN, H. R.; EIDELMAN, F.; PONTEDEIRO, E.. Waste management in Brazil. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Management of Low and Intermediate Level Radioactive Wastes: proceedings of international symposium on...held in Stockholm, May 16-20 1988*. Vienna, 1989. (IAEA-SM-303/120)
30. GARCIA JR., O. *Isolamento e Purificação de Thiobacillus ferrooxidans e sua aplicação na biometalurgia do Urânio*. Campinas, 1989. (Tese de doutoramento do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas)
31. GRAGNOLINO, G. & TUOVINEN, O .H. The role of sulphate-reducing and sulphur-oxidizing bacteria in the localized corrosion of iron-base alloys - a review. *Int. Biodeterior.* ,20 (1): 9-26, 1984.

32. HODGKINSON, D. P., and COOPER M. J., eds. Nirex Safety Assessment Research Programme. Annual Report for 1985/86 Nirex Report N° 34. Harwell (UK), United Kingdom Nirex, Ltd., Jan. 1987. p: 44-51 (UKN-34)
33. HUTCHINSON, M. ; JOHNSTONE, K. I. ; WHITE, D. The taxonomy of certain Thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.* , 41: 357-366, 1965.
34. HUTCHINSON, M. ; JOHNSTONE, K. I. ; WHITE, D. The taxonomy of Anaerobic Thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.* , 44: 17-23. 1967.
35. HUTCHINSON, M. ; JOHNSTONE, K. I. ; WHITE, D. Taxonomy of the genus *Thiobacillus*: the outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. *J. Gen. Microbiol.*, 57: 397-410, 1969.
36. INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Boletim IPT N° 25*, 1940.
37. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Shallow ground disposal of radioactive waste*. Vienna, 1981. (IAEA- SS-53)
38. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Design, construction, operation, shutdown and surveillance of repositories for solid radioactive wastes in shallow ground*. Vienna, 1984. (IAEA-SS-63)
39. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Safety analysis methodologies for radioactive waste repositories in shallow ground*. Vienna, 1984. ((IAEA-SS-64)
40. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Acceptance criteria for disposal of radioactive wastes in shallow ground and rock cavities*. Vienna, 1985. (IAEA-SS-71)
41. KARAVAIKO, G. I. ; ZHEREBYATEVA, T. V. Bacterial corrosion of concrete. *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, 306(2): 477-481, 1989.
42. KELLY, D. P. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur. *Philos. Trans. Soc. Lond. B* , 298: 499-528, 1982.
43. KELLY, D. P. & HARRISON, A. P. Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms. Genus *Thiobacillus*, Beijerinck 1904 b, 597 **AL**. In: Staley, J. T. ; Bryant,

- M. P. ; Pfening, N.T. and Holt, J.R. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkings, 1989, V.3; sec.20 p.1842-1853.
- 44.KERGER, B. D.; NICHOLS, P. D.; ANTWORTH, C. P.; SAND, W.; BOCK, E.; COX, J.C.; ANGWORTH, T. A. and WHITE, C. D.. Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus* spp.: metoxy, cyclopropyl, alpha-hidroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* , **38**: 67-77, 1986.
- 45.KERGER, B. D. ; NICHOLS, P. D. ; SAND, W. ; BOCK, E. ; WHITE, D. C. Association of acid producing thiobacilli with degradation of concrete: analysis by "signature" fatty acids from the polar lipids and lipopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.* , **2**: 63-69, 1987.
- 46.KUENEN, J.G. & BEUDEKER, R. F. Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Philos. Trans. Soc. Lond. B* **298**: 473-497, 1982.
47. LATORRE, W. C. & GAYLARD, C.C. coods. *Biodeterioração: anais do 1º Simpósio Latino americano de... realizado em Campos do Jordão, 30 Agosto - 2 Setembro, 1992*.
- 48.LENINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*, São Paulo, Sarvier, 1988.
- 49.LOPES, E. S.; OLIVEIRA, M. L. C. ; IGUE, T. Levantamento da atividade de microrganismos envolvidos na oxidação do enxofre em solos do estado de São Paulo. In: *CIÊNCIA do solo: Anais do XV congresso brasileiro de...* , realizado em Campinas, 14 a 17 de junho, 1975.
- 50.McGAHAN, D. J.. *Survey of microbiological effects in low-level radioactive waste disposed of to land*. Harwell, United Kingdom Atomic Energy Authority, 1987. (AERE R 12477).
- 51.MILDE, K. ; SAND, W. ; WOLFF, W. ; BOCK, E. Thiobacilli of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. *J. Gen Microbiol.* , **129**: 1327-1333, 1983.
- 52.MOOSAVI, A. N.; DAWSON, J. L.; KING, R. A. The effect of sulphate-reducing bacteria on the corrosion of reinforced concrete. In: *Dexter S.C. ed. Biologically induced corrosion: Proceedings of the International conference on...held in Gaithersburg, M.D., June, 1985*. Houston, TX., Nat. Assoc. of Corrosion Engineered, 1985. p. 291-308. (International Corrosion Conference Series; NACE-8).

53. MOURA, R. de A. *Técnicas de Laboratório* 3ª ed. Rio de Janeiro, Atheneu Rio de Janeiro, 1987. p: 188.
54. PANKHANIA, I. P. Hydrogen metabolism in Sulphate Reducing Bacteria and its role in anaerobic corrosion. *Biofouling*, **1**: 27-47, 1988.
55. PANKHURST, E. S.. Polarographic evidence of the production of polythionates during the bacterial oxidation of thiosulfate. *J. Gen Microbiol.*, **34**:427-439, 1964.
56. PARKER, C. D. The corrosion of concrete. I. The isolation of a specie of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmosphere containing hydrogen sulphide. *J. Biol. Exper. Med. Sci.* **23**: 81-90, 1945.
57. PARKER, C. D. The corrosion of concrete. II. The function of *Thiobacillus concretivorus* (nov.spec) in the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulfide. *J. Biol. Exper. Med. Sci.* **23**: 91-98, 1945.
58. PARKER, C. D. & PRIST, J. The oxidation of inorganic compounds of sulphur by various sulphur bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **8**: 344-364, 1953.
59. PARKER, C. D. Bacteriology of corrosion process. In: MELBOURNE AND METROPOLITAN BOARD OF WORKS. *Hydrogen Sulphide Corrosion of Concrete Sewers*. Melbourne, 1965. Pt.6. Section 1 (Technical Paper nº A.8).
60. PARON, M. R. & SANTOS, J. E. Estimativa do número de tiobacilos em sedimentos aquáticos (represa do Lobo, Brotas - Itirapina, SP). *Ciênc. e Cult.* **36**(9): 1592-1596, 1983.
61. PARSONS, P. J.. *Movement of radioactive waste through soil 3. Investigating the migration of fission products from high-ionic liquid deposited in soil*. Chalk River, Ontario, Atomic Energy of Canada, Aug. 1961. (CER-1018; AECL-1325)
62. PEDERSEN, K.. Potential effects of bacteria on radionuclide transport from a Swedish high level nuclear waste repository. *Technical Report SKF-TR 90-05*, 1990.
63. PERFETTINI, J.. *Étude de l'alteration d'un matériau d'ensrobage des déchets radioactifs, le ciment CPA, par des microorganismes hétérotrophes isolés de milieux naturels*. Marseille. 1989. (Thèse de Docteur en Sciences. Université de Droit, d'Économie et de Sciences d'Aix-Marseille III).

64. PHILIPSE, K. E. *500 Years concrete for a radioactive waste repository*. Chalk River, Ontario, Atomic Energy of Canada Limited, March 1988. (AECL-9721).
65. RIBAS SILVA, M. *Étude de la microstructure du béton sous influence de variations hygrométriques importantes*. Paris, 1990. (Thèse doctorat de L'ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES)
66. RIGDON, J. H. & BEARDSLEY, C.W. Corrosion of concrete by Autotrophes. *Corrosion*, 14: 206-208, 1958.
67. RINGEARD, C. Ultimate disposal of low and medium radioactive waste in France. In: BASCHWITZ, R.; KOHOUT, R.; MAREK, J ; RICHTER, P. I. ; SLATE, S. C. eds. *Proceedings of the 1993 International Conference on Nuclear Waste Management and Environmental Remediation holding on Prague, September 5-11, 1993*. Vol 3 : p.17-24.
68. ROSE, A.H. *Economic Microbiology Vol 6: Microbial Biodeterioration*. London, Academic, 1981.
69. RUPELA, O.P. & TAURO, P. Isolation and characterization of *thiobacillus* from alkali soils. *Soil Biol. Biochem.* , 5: 891-897, 1973.
70. RUSHBROOK, P.E.. A survey of possible microbiological effects within shallow land disposal sites designed to accept intermediate-level radioactive wastes. Harwell, UKAEA Atomic Energy Research Establishment, 1985. (AERE R 11408)
71. SAND, W. & BOCK, E. Concrete corrosion in the Hamburg sewer system. *Environ. Technol. Lett.* , 5: 517-528, 1984.
72. SAND, W. & BOCK, E. Biogenic sulfuric acid attack in sewage systems. In: HOUGHTON, D.R.; SMITH, R.N.; EGGINS, H.O.W. eds. *Biodeterioration 7: selected papers present at the seventh International Symposium, held in Cambridge, Set. 6-11, 1987*. London, Elsevier, s.d. p.113-17.
73. SAND, W. & BOCK, E.. Biodeterioration of ceramic materials by biogenic acids. *Int. Biodeterior.* , 27: 175-183. 1991.

74. SAND, W. & BOCK, E.. Biodeterioration of mineral materials by microorganisms - Biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiol. J.* , **9**: 129-138, 1991.
75. SAND, W. , BOCK, E & WHITE, C. D. Biotest system for rapid evaluation of concrete resistance to sulphur-oxidizing bacteria. *Mat. Performance* , **26** N<sup>03</sup> : 14-17, 1987.
76. SAND, W.. Importance of hydrogen sulfide, thiosulfate, methylmercaptan for growth of thiobacilli during simulation of concrete corrosion. *Appl. Environ. Microbiol.* , **53**(7): 1645-1648, 1987.
77. SHIRAKAWA, M. A., ATENCIO, D. , GARCIA Jr., O e RZYSKI, B. M.. Ocorrência de Bactérias do gênero *Thiobacillus* associadas a processo de intemperismo de sulfetos da Formação Itaquaquecetuba, Bacia de São Paulo *An. Acad. Bras. Ciênc.* , **63**(1): 89-90, 1991.
78. SHIRAKAWA, M.A., GARCIA Jr, O E RZYSKI, B. M.. Isolamento e purificação de *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans* do Porto de areia de Itaquaquecetuba - São Paulo. *Rev. Microbiol.* , **22**, (3), supl.1, 1991.
79. SHIRAKAWA, M. A., SATO, M. I., SANCHES, P.S., CINCOTTO, M. A. & RZYSKI, B. M. Deterioração do concreto associada ocorrência de *Thiobacillus*. In: LATORRE, W.C. & GAYLARD, C.C. coords. *Biodeterioração: anais do 1º Simpósio Latino americano de ... realizado em Campos do Jordão, 30 Agosto - 2 Setembro, 1992*. p.200-10.
80. SILVERMAN, M. P. & LUNDGREN, G.. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*.I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* , **77**:642-647. 1959.
81. SUAREZ, A. A., RZYSKI, B. M., MARUMO, J. T., SHIRAKAWA, M. A. and MIYAKE, E. T.. *Evaluation of engineered barrier materials for surface disposal facilities*. (Paper present at the 1st Research Coordinated Meeting, held in Sellafield, 21-25, October), 1991.
82. TAYLOR, B. F.; HOARE, D. S.; HOARE, S. L.. *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph. Isolation and growth studies. *Arch. Mikrobiol.* , **78**: 193-204, 1971.

83. TAYLOR, C. B. & HUTCHINSON, G. H. Corrosion of concrete caused by sulphur-oxidizing bacteria. *J.S.C.I.* , **66**: 54-57, 1947.
84. THORNTON JR., H. T. Acid attack of concrete caused by sulfur bacteria action. *J. Am. Conc. Inst.* , **75**: 577-584, 1978.
85. TRUDINGER, P.A. Metabolism of thiosulfate and tetrathionate by heterotrophic bacteria from soil. *J. Bacteriol.* **93**(3): 550-559, 1967.
86. TUOVINEN, O. H. & HSU, J. Aerobic and anaerobic microorganisms in tubercles of the Columbus, Ohio, water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* , **44**(Nº3): 761-764, 1982.
87. VIDELA, H. A. Corrosão Microbiológica. Editora Edgard Blücher Ltda., 1981.
88. VISHNIAC, W. & SANTER, M. The Thiobacilli. *Bacteriol. Rev.* , **21**: 195-213. 1957.
89. VOGEL, A. I. *Análise inorgânica quantitativa*. 4ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Dois, 1981.
90. VOINOVITCH, I. L'analyse rapide des ciments. *Chim. Anal.* , **50**(6): 334-348, 1968.
91. WAKSMAN, S. & JOFFE, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *J. Bacteriol.* , **7**: 239-257, 1922.
92. WOOLLEY, D.; JONES, G.L. & HAPPOLD, F.C. Some metabolic differences between *Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificans* and *T. thiocyanoxidans* *J. gen Microbiol.* , **29**: 311-316, 1962.
93. ZULOAGA, P.; GRÁVALOS, J. M. El Cabril a near surface repository of I/LLW in Spain In: BASCHWITZ, R.; KOHOUT, R.; MAREK, J; RICHTER, P. I. ; SLATE, S. C. eds. *Proceedings of the 1993 International Conference on Nuclear Waste Management and Environmental Remediation helding on Prague, September 5-11, 1993*. Vol 3: p.25-30.

## ANEXO I

### SOLUÇÕES

- **Solução de traços de elementos (21)**  
(solução usada na composição do meio de Postgate modificado)

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -----	2,90 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O-----	1,80 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,20 g
[(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O]-----	0,03 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,08 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	1,90 g
CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,10 g
Água destilada-----	1000 mL

Pesar os reagentes e acrescentar 1000 mL de água destilada e homogeneizar. Aquecer lentamente até completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar por filtração com membrana de porosidade 0,20 µm. Armazenar em frasco escuro, bem vedado, em geladeira.

- **Água de diluição(21)**

Solução estoque A-----	1,25 mL
Solução estoque B-----	5,00 mL
Água destilada-----	1000mL
pH final após esterilização: 7,2 ± 0,1	

Preparar a solução estoque A com a seguinte composição:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	34,00 g
Água destilada-----	1000 mL

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,1, com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121 ± 2°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira. Antes da utilização da solução estoque A, deve-se verificar se não há evidência de contaminação microbiana. Em caso afirmativo, descartar a solução.

Preparar a solução estoque B com a seguinte composição:

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	81,10 g
Água destilada -----	1000 mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para um litro de água destilada; armazenar em geladeira.

Adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B e completar o volume para um litro de água destilada. Distribuir em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após esterilização em autoclave a  $121 \pm 0^{\circ}\text{C}$  durante 15 min., volumes de 90 mL  $\pm$  2 mL.

• **Reagentes para coloração de Gram (52)**

**Cristal violeta de Hucker:**

Solução A:

Cristal violeta-----	2 g
Álcool etílico a 95%-----	20 mL

Solução B:

Oxalato de amônio-----	0,8 g
Água destilada-----	80 mL

Filtrar em papel de filtro após 24 hs

**Lugol:**

Num gral, juntar 1 g de iodo, 2 g de iodeto de potássio e triturar. Adicionar em pequenas quantidades o volume de 300 mL de água destilada. Preparar em quantidade suficiente que seja utilizada antes de 30 dias.

**Corante de fundo de Hucker (solução estoque):**

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico. Para usar, juntar 10 mL desta solução estoque em 90 mL de água destilada.

## ANEXO II

### MEIOS DE CULTURA

#### • Meios de cultura para *T.thioparus*

Meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus*(21) (em concentração simples)

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O-----	5,00 g
NH <sub>4</sub> Cl-----	1,00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	3,00 g
CaCl <sub>2</sub> -----	0,10 g
MgSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,50 g
Solução traços de elementos-----	1,00 mL (ver Anexo II)
Vermelho de fenol-----	0,018 g
Água destilada -----	1000 mL
pH final após esterilização 7,4	

Pesar todos os reagentes, exceto a solução traços de elementos e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução dos reagentes, tomando cuidado para não atingir a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 com NaOH - 1N. Esterilizar em autoclave a  $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Estabilizar o meio a temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$  e juntar 1,0 mL da solução de traços de elementos estéril recentemente preparada. Distribuir asépticamente, com agitação constante, em tubos de ensaio esterilizados. Armazenar sob refrigeração por período máximo de duas semanas.

Para a elaboração do meio de concentração dupla, pesar o dobro de reagentes para o mesmo volume de meio de concentração simples.

#### Méio sólido de Postgate modificado para *T.thioparus*

Pesar a mesma quantidade de reagentes para o preparo de 1 litro de meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus*, porém adicionar 500 mL de água destilada, obtendo um meio de concentração dupla. Em outro erlenmeyer pesar 15 g de agar e adicionar 500mL de água destilada. Aquecer até completa dissolução do agar. Autoclavar separadamente e misturar o conteúdo dos dois dos frascos quando ambos atingirem a temperatura aproximada de  $50^{\circ}\text{C}$ , para se obter o meio sólido de concentração simples. Distribuir cerca de 20 mL em placas de Petri previamente esterilizadas.

**Meio líquido ATCC 238 adaptado para *T.thioparus* (0,5% de tiosulfato de sódio)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0,1g	
NH <sub>4</sub> Cl-----		0,1g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,1g	
CaCl <sub>2</sub> -----		0,1g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O-----		5,0g
Água destilada-----	1000mL	

Pesar todos os compostos, dissolvê-los separadamente, juntar as soluções e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Ajustar o pH com NaOH 1N para  $7,5 \pm 0,2$  Esterilizar em autoclave a  $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Armazemar em geladeira por um período máximo de duas semanas.

• **Meios de cultura para *T.thiooxidans*** OK

**Meio líquido de Postgate modificado para *T thiooxidans* (21)(concentração simples)**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O-----	5,00 g	OK
NH <sub>4</sub> Cl-----	1,00 g	OK
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	3,00 g	OK
CaCl <sub>2</sub> -----	0,10 g	OK
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,50 g	OK
Solução traços de elementos-----	1,00 mL	(ver Anexo I)
Vermelho de fenol-----	0,018 g	
Verde de bromocresol-----	0,01 g	
Água destilada-----	1000 mL	

pH final após esterilização : 4,5

Proceder da mesma forma como para o preparo do meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus*, ajustar o pH para 4,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 10N.

**Meio sólido de Postgate modificado para *T.thiooxidans***

Pesar os mesmos reagentes que no item anterior e dissolver em 500 mL de água destilada, para obter concentração dupla. Em frasco separado, pesar 15 g de agar e adicionar 500 mL de água destilada. Aquecer até completa dissolução do agar. Autoclavar os frascos, separadamente, a  $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 min.. Quando as soluções atingirem uma temperatura aproximada de  $50^{\circ}\text{C}$ , misturar o conteúdo dos frascos e distribuir o meio em placas de Petri, previamente esterilizadas.

**Meio líquido ATCC 238 adaptado com 1% de S<sup>0</sup>**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0,1g
NH <sub>4</sub> CL-----	0,1g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,1g
CaCl <sub>2</sub> -----	0,1g
Enxofre elementar-----	10,0g
H <sub>2</sub> O destilada -----	1000mL

Dissolver os sais separadamente em água destilada e completar o volume até 1000 mL, ajustar o pH para 4,2 com HCl e esterilizar em autoclave a 121 ± 2°C por 20 min.

Esterilizar separadamente o enxofre por tinalização (30 minutos em vapor fluente durante três dias consecutivos). Utilizar 1 g de enxofre para 100 mL de meio líquido.

**Meio líquido ATCC 238 adaptado com 1% de S<sup>0</sup> (pH =12)**

Proceder como no meio anterior, ajustando o pH final com NaOH 10 N

**Meio sólido ATCC 238-tiosulfato-agar<sup>(30)</sup> ok**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0,1g
NH <sub>4</sub> C-----	0,1g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,1g
CaCl <sub>2</sub> -----	0,1g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O-----	5,0g
Água destilada -----	1000mL
Agar-----	15g

Dissolver os sais, separadamente, em água destilada até completar 500 mL de volume, ajustar o pH para 4,2 com HCl e esterilizar em autoclave a 121 ± 2°C por 20 min. Dissolver separadamente o agar em água destilada e esterilizar nas mesmas condições. Após a esterilização esperar que ambas as soluções atinjam temperatura de aproximadamente 50°C, e misturar as duas soluções Este esfriamento prévio do agar é fundamental para evitar a sua hidrólise. Após a mistura das duas soluções distribuir o meio em placas de Petri, previamente esterilizados.

**Meio 9K-S<sup>0</sup> (21)**

Solução 1: (sais de base)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	3,00 g
KCl-----	0,10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0,50 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,50 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -----	0,01 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10 N)-----	1,00 mL
Água destilada-----	1000 mL

pH final após esterilização : 2,8 a 3,0

Para o preparo desta solução, pesar os reagentes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Ajustar o pH para 2,8 a 3,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -10 N. Dissolver os sais por aquecimento agitando freqüentemente até a ebulição, evitar aquecimento excessivo. Esterilizar em autoclave a 121 ± 2°C durante 15 min. Após a esterilização, estabilizar a temperatura para 55°C. Adicionar 1 g de enxofre elementar, esterilizado separadamente por tinalização, para cada 100 ml de meio líquido da solução 1.

- **Meios de cultura para *T ferrooxidans***

**Meio líquido 9K-Fe<sup>2+</sup>(21)**

**Solução 1: (sais de base)**

Preparar a mesma formulação da Solução 1 do meio 9K-S<sup>0</sup>, porém, adicionar 700 ml de água destilada.

**Solução 2:**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	44,22 g
Água destilada.qsp-----	300 mL

Pesar 44,22 g de sulfato ferroso, colocar em um balão volumétrico de 300 mL e completar o volume com água destilada acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 10N (pH 2,8). Homogeneizar até completa dissolução esterilizar por filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm.

Preparo do meio 9K-Fe<sup>2+</sup> : juntar 700 mL da solução 1 e 300 mL da solução 2 com todos os cuidados de assepsia.

**Meio "TK " sólido para *T.ferrooxidans*(30)**

**Solução A**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,5g
H <sub>2</sub> O destilada -----	1000mL

**Solução B**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	167g
H <sub>2</sub> O destilada -----	1000mL

Dissolver separadamente os sais referentes à solução A, juntar os solutos, completar com água destilada até 1000 mL, ajustar o pH para 1,8 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e autoclavar a 121 ± 2°C por 15 min. A solução B deve ser filtrada por membrana de 0,22 µm após o ajuste do pH para 1,8 com com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. As soluções devem ser estocadas separadamente em geladeira (4°C) e no momento do uso , utilizar uma proporção de 4:1 respectivamente da solução A e B. Para de obter o meio sólido "TK" deve-se preparar o meio em concentração dupla em um frasco e uma solução de agarose 0,5% em outro, esterilizando a agarose em autoclave nas condições da solução A. Misturar o conteúdo dos dois frascos quando ambos estiverem a aproximadamente 50°C e distribuir em placas de Petri préviamente esterilizadas.

- **Meio de cultura para indicação de espécie anaeróbia (*T.denitrificans*)**

Utilizou-se o meio líquido de Postgate modificado para *T.thioparus*, adicionando-se a esse meio, 2,0 g/L de nitrato de potássio e 1g/L de bicarbonato de sódio

• **Meio de Starkey para bactérias sulfato-redutoras (*Desulfovibrio*)<sup>(20)</sup>**

Lactato de sódio-----	3,5 g
NH <sub>4</sub> Cl-----	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	2,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O-----	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .FeSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,001 g
Água destilada-----	1000 mL

pH final após esterilização : 7,2

Pesar todos os reagentes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução dos sais, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH - 1N. Distribuir em tubos de ensaio. Esterilizar em autoclave a 121 ±2°C por 15 min.

• **Meio Agar triptona glicose extrato de levedura para contagem de de bactérias heterotróficas<sup>(22)</sup>**

**Meio Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura ("Plate Count Agar")**

Triptona-----	5,0 g
Extrato de levedura-----	2,5 g
Dextrose-----	1,0 g
Agar-----	15,0 g
Água destilada-----	1000 mL

pH final após esterilização: 7,0

Pesar 23,5 g do meio desidratado "Plate Count Agar" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente 15 min. Aquecer agitando freqüentemente, até completa fusão do meio, tomando cuidado para que não atinja a temperatura de ebulição, se necessário, ajustar o pH para 7,0 com solução de NaOH - 1N. Esterilizar em autoclave a 121 ±2°C durante 15 minutos.

• **Agar Sabourand Dextrose para contagem de fungos<sup>(23)</sup>**

Neopeptona-----	10 g
Glicose (dextrose)-----	40 g
Agar-----	15 g
Água destilada-----	1000 mL

pH Final após esterilização: 5,6

Pesar 65 g do meio desidratado "Sabourand Dextrose Agar" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Aquecer agitando freqüentemente até completa fusão do meio. Tomar cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir em volumes de 8 a 10 mL em tubos de ensaio com diâmetro de 16 mm x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121 ± 2°C durante 15 min.

• **Meios de cultura para os testes preliminares de identificação para *Thiobacillus*<sup>(35)</sup>**

**Meio líquido mineral básico SO**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	1,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> -----	0,03 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O-----	0,02 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O-----	0,02 g
Água destilada-----	1000 mL

Preparo: Pesar os sais e dissolver separadamente. Juntar posteriormente e completar o volume para 1000 ml com água destilada.

**Meio S6 líquido ( para cepas neutrofilicas)**

Adicionar 10 g de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O) para 1000 mL de Meio líquido mineral básico SO. Esterlizar em autoclave a 121±2°C durante 15 minutos.

**Meio S8 ( para *Thiobacillus denitrificans* )**

Adicionar ao meio mineral básico SO : 0,5 g de NaHCO<sub>3</sub> e 2,5 g KNO<sub>3</sub> para 1000 mL de meio SO. Distribuir em tubos de ensaio contendo tubo de Duhram. Esterlizar por autoclave a 121±2°C durante 15 minutos.

**Meio S5 ( para cepas acidofilicas)**

Neste caso, o meio mineral básico SO não deve conter Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , utiliza-se somente 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fosfato. Adicionar também 1 g de NaCl em 1000 mL de meio mineral SO. Esterlizar em autoclave a 121 ±2°C durante 15 minutos.

**Meio S7**

Adicionar 0,02 g NH<sub>4</sub>CNS em 1000 mL de meio mineral básico SO. Esterlizar em autoclave a 121 ±2°C durante 15 minutos.

**Meio SO + 6% de tiosulfato**

Adicionar 60 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.H<sub>2</sub>O aos demais compostos da fórmula do meio mineral básico SO e completar o volume par 1000 mL de água destilada estéril. Esterlizar em autoclave a 121 ±2°C durante 15 minutos.

**Meio S6 ou S5 + 4% de fosfato**

Adicionar 40 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> aos demais componentes do meio S6 ou S5. Completar o volume com água destilada até 1000 mL. Esterilizar em autoclave por 15 min a 121.±2°C

**Meio S6 ou S5 + 5% de NaCl**

Adicionar 50 g de NaCl aos demais componentes do meio S6 ou S5. Completar o volume com água destilada até 1000 mL. Esterilizar em autoclave por 15 min. a 121.±2°C

### Meio S6 ou Meio S5 com enxofre elementar

Substitui-se o tiosulfato dos meio S6 ou S5 por enxofre S<sup>0</sup> como fonte de energia (1% em relação ao volume do meio). Esterilizar o enxofre, separadamente, por tindalização. e acrescentar ao meio líquido esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 ±2°C.

### Meio sólido de Citrato de Simmons

NaCl-----	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	1,0 g
Citrato de sódio-----	2,0-5,0 g
Ágar-----	20,0 g
Azul de bromotimol-----	0,08 g (solução a 0,002%)
Água destilada-----	1000 mL

Pesar todos os componentes e adicionar 1000 mL de água destilada. Distribuir em tubos de ensaio. Esterilizar em autoclave por 15 minutos à temperatura de 121 ±2°C. Manter os tubos inclinados até solidificação do meio.

### Agar nutriente

Extrato de carne-----	3g
Peptona-----	10g
Ágar-----	15g
Água destilada-----	1000mL

Pesar os componentes e adicionar 1000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 1N. Distribuir em tubos de ensaio e esterilizar por 15 minutos à temperatura de 121 ± 2°C. Manter os tubos inclinados até solidificação do meio.