

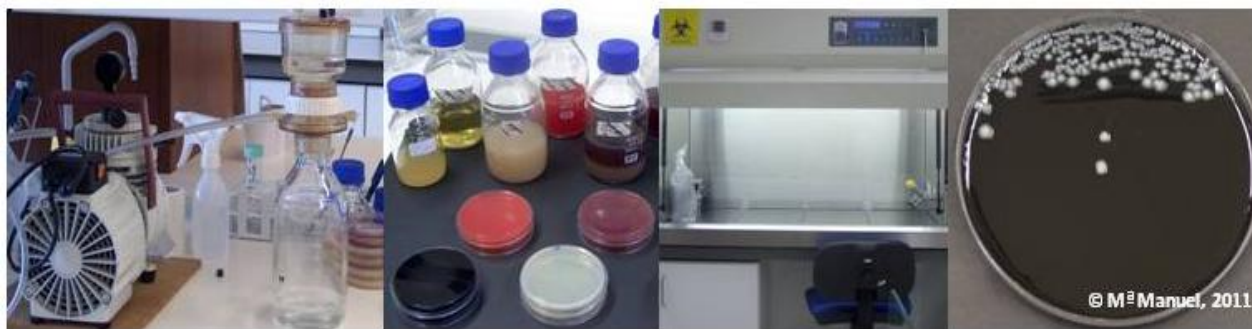
ACEITE PARA PUBLICAÇÃO EM 11 DE SETEMBRO DE 2012



**casa das ciências.org**

# PROJETO NO ENSINO DA (MICRO)BIOLOGIA

UM GUIA DO PROFESSOR COM SUGESTÕES DE ATIVIDADES PARA  
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA



2011





**Maria Manuel Loureiro Azevedo Gomes**

Faculdade de Ciências Universidade Porto  
Escola E.B. 2,3 /Secundária de Baião



# **PROJETO**

## **NO ENSINO DA (MICRO)BIOLOGIA**

UM GUIA DO PROFESSOR COM SUGESTÕES DE ATIVIDADES PARA  
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

**2011**

## ÍNDICE

### PLANIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1. APRESENTAÇÃO.....              | 4 |
| 2. RESUMO .....                   | 4 |
| 3. OBJETIVOS .....                | 5 |
| 4. CONTEXTUALIZAÇÃO .....         | 5 |
| 5. ENQUADRAMENTO CURRICULAR ..... | 7 |
| 6. AVALIAÇÃO .....                | 8 |

### 1. INTRODUÇÃO AO TRABALHO LABORATORIAL

|  |    |
|--|----|
| 1.1 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO .....   | 9  |
| 1.2 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DE OBJETOS E DE CONTROLO DO CRESCIMENTO<br>DE MICRORGANISMOS..... | 12 |
| 1.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL DE LABORATÓRIO .....                            | 16 |
| 1.4 REGISTOS DE LABORATÓRIO .....  | 23 |
| 1.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS .....   | 23 |

### 2. MICROBIOLOGIA DA ÁGUA

|   |    |
|---|----|
| 1. APRESENTAÇÃO DO TEMA.....                                | 32 |
| 2. CRITÉRIOS E GRAUS DE EXIGÊNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA..... | 32 |
| 3. ÁGUAS SUPERFICIAIS E SUBTERRÂNEAS .....                  | 33 |
| 4. CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS DE BACTÉRIAS .....              | 34 |
| 5. MÉTODO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA .....           | 38 |
| 6. TESTE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....             | 39 |
| 7. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA .....                     | 41 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 44 |
|----------------------------------|----|

### PROTOCOLOS PARA OS ALUNOS

## PLANIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES

### 1. APRESENTAÇÃO

A atribuição de uma licença sabática, pelo Ministério da Educação, permitiu a elaboração da dissertação de mestrado “*Bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas subterrâneas e superficiais do concelho de Baião*”, realizada na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Na sequência dessa tese foi realizado este trabalho que compila um conjunto de atividades experimentais, adaptadas ao contexto escolar, que visam fazer um estudo da microbiologia da água da região onde se insere a escola.

As atividades estão organizadas de modo a permitir aos professores selecionar aquela(s) que pretendam desenvolver, de acordo os conteúdos programáticos dos anos letivos que se encontram a lecionar. Adicionalmente, estas atividades poderão ser integradas sob a forma de um projeto a ser desenvolvido numa área não curricular, como são exemplo os Clubes de Ciências Experimentais, permitindo o desenvolvimento de capacidades cognitivas, procedimentais e atitudinais que implicam tempo para a sua execução.

### 2. RESUMO

Este trabalho é constituído por um conjunto de atividades experimentais que se apresentam em três partes: Planificação das Atividades; Introdução ao Trabalho Laboratorial e o Estudo da Microbiologia da Água. Como suplemento disponibilizam-se protocolos para os alunos.

#### 1ª Parte- Introdução ao trabalho laboratorial

Esta fase é de primordial importância para que as atividades a desenvolver ocorram sem incidentes. O professor transmitirá aos seus alunos um conjunto de regras de (bio)segurança essenciais ao trabalho laboratorial em microbiologia. É também nesta fase que os alunos se familiarizarão com as técnicas básicas usadas em microbiologia e eventualmente realizarão algum trabalho, de carácter investigativo, de forma mais autónoma.

Os procedimentos a desenvolver nesta fase, incluem:

- Informação das regras de (bio)segurança no laboratório;
- Organização do trabalho laboratorial;
- Identificação do material de laboratório;
- Conhecimento do funcionamento e utilização dos instrumentos e materiais de laboratório;
- Conhecimento do tratamento dos resíduos;
- Registar de forma correta as observações realizadas;
- Pesquisar informação fidedigna;

- Execução de técnicas de assepsia;
- Preparação de meios de cultura;
- Preparação de soluções;
- Executar técnicas usadas em microbiologia;
- Observação de bactérias ao microscópio;

## **2ª Parte- Microbiologia da água**

Nesta fase pretende-se desenvolver um trabalho laboratorial de análise microbiológica de água de diferentes origens, tendo em conta os critérios e os métodos analíticos de referência a utilizar na avaliação da qualidade das águas destinadas ao uso humano em Portugal (Diário da República no Decreto-Lei nº 306/2007).

Inicialmente procede-se à deteção de microrganismos comensais de origem intestinal, quer humana quer animal, como é o caso de bactérias pertencentes aos grupos dos coliformes e dos enterococos fecais. Posteriormente, procede-se à realização do teste de suscetibilidade a antibióticos para as bactérias detetadas e enumeradas na fase inicial.

## **3. OBJETIVOS**

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Tirar conclusões com base em resultados obtidos em atividades experimentais.
- Inferir os perigos para a saúde individual e pública da contaminação bacteriológica.
- Apresentar medidas de higienização.
- Prever consequências do aumento de bactérias resistentes a antibióticos.

## **4. CONTEXTUALIZAÇÃO**

O acesso a água potável é essencial para a saúde humana bem como um direito básico, constituindo uma medida política eficaz de proteção da saúde (WHO, 2008). Atualmente assiste-se a uma crescente pressão sobre a qualidade e quantidade dos recursos hídricos e ao seu acesso.

Bactérias, vírus e protozoários são os três principais grupos de microrganismos que se podem encontrar em água para consumo humano. Estes microrganismos, que podem causar doenças infecciosas, podem ocorrer naturalmente na água mas muitas vezes a sua ocorrência resulta da contaminação por resíduos de origem humana ou animal. Águas superficiais, como rios e lagoas, são mais propícias a conterem microrganismos do que as águas subterrâneas, exceto quando estas se encontram sob influência direta das águas superficiais (Health Canada, 2006).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde o aumento da população humana, que se prevê ser de 7,7 milhares de milhões em 2020 e 9,4 milhares de milhões em 2050, implicará um aumento da produção animal e uma maior exploração agrícola. Este aumento de população acarretará uma maior libertação de excrementos que chegarão ao ambiente contribuindo assim para a ocorrência e distribuição de doenças zoonóticas transmitidas através da água (Bolin *et al.*, 2004).

Cerca de 2,5 milhares de milhões de pessoas em todo o mundo vivem sem saneamento e mais de 1,5 milhões de crianças morrem por ano devido a doenças diarreicas (Fenwick, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a mortalidade causada por doenças associadas a água contaminada excede 5 milhões de pessoas por ano e destas 50% são infeções intestinais. Deste modo, doenças relacionadas com água contaminada não só são a principal causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, como também estão a aumentar.

O aumento da população humana e animal tem sido também acompanhado pelo aumento do uso de antibióticos. Estima-se que mundialmente, por ano, sejam utilizados entre 100.000 a 200.000 toneladas de antibióticos pela população humana, na produção animal, na agricultura e até na aquacultura (Wise, 2002).

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização no tratamento de infeções constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a eficácia dos antibióticos foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se oporem à sua ação. Atualmente é apontada como principal causa para o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos o consumo de antibióticos (Swartz e Kunin, 1997). Os antibióticos chegam ao ambiente aquático resultado da sua excreção durante os tratamentos para os quais são utilizados, pois não são totalmente metabolizados, ou do despejo direto nos esgotos a nível doméstico, hospitalar ou industrial (Kummerer, 2009; Rooklidge, 2004).

A água para abastecimento público deve ser analisada periodicamente para se garantir a ausência de microrganismos patogénicos. A deteção destes microrganismos constitui a prova mais direta de uma contaminação perigosa das águas. Contudo, estes microrganismos quando presentes, encontram-se em pequeno número e apesar de se encontrarem num estado viável os métodos utilizados para o seu isolamento e quantificação são frequentemente morosos e complexos (Chigbu e Sobolev, 2007). Assim, como indicação de poluição potencialmente perigosa, recorre-se à deteção de microrganismos comensais de origem intestinal, quer humana quer animal, designados microrganismos indicadores (WHO, 2004). É o caso de bactérias pertencentes aos grupos dos coliformes e dos enterococos fecais. Estas bactérias indicadoras não são geralmente perigosas, mas revelam a existência de uma contaminação fecal da água e, consequentemente, a possibilidade de estarem presentes bactérias patogénicas.

A eliminação total de microrganismos patogénicos causadores de doenças transmitidas através da água é praticamente impossível. No entanto, a adoção de medidas de proteção dos locais de captação de água para consumo humano, a manutenção da rede de distribuição e a utilização de métodos de tratamento apropriados e eficazes, reduzem o número de microrganismos presentes na água (Health Canada, 2006).

## 5. ENQUADRAMENTO CURRICULAR

As sugestões metodológicas do Ministério da Educação, para o Ensino das Ciências, apontam para o recurso a estratégias de ensino que valorizem o trabalho prático como parte integrante e fundamental do processo de ensino-aprendizagem. As estratégias devem por isso ser baseadas em atividades de indagação e pequenas investigações, com recurso a atividades experimentais laboratoriais. Os alunos poderão desenvolver competências diversas como a utilização do microscópio ótico, colocação de problemas ligados à Ciência e Tecnologia, a apresentação gráfica de dados, a execução de relatórios de atividades de pesquisa, a pesquisa autónoma de informações em diferentes suportes, entre outras, sem esquecer o reforço das capacidades de escrita e oral e o recurso às novas tecnologias de informação.

Analizando os programas curriculares de Ciências Naturais do 3º ciclo do Ensino Básico e de Biologia do Secundário, podemos encontrar e/ou aplicar a temática biotecnologia abordada em vários níveis, nomeadamente nos programas das disciplinas de Ciências Naturais do 9º ano, de Biologia e Geologia do 10º e 11º anos, de Biologia do 12º ano e Geologia do 12º ano.

No 9º ano aborda-se de que modo a Ciência e Tecnologia podem contribuir para a melhoria da qualidade de vida, este tema é transversal e vai sendo abordado ao longo do 3º ciclo, em diferentes situações. Mas é ao nível do 9º ano que se aprofundam aspetos específicos, essenciais para a compreensão e tomada de decisões face a assuntos que preocupam a Sociedade, debatendo-se problemas ambientais, económicos e sociais.

No 10º ano, na Unidade 3 - Transformação e utilização de energia pelos seres vivos - aborda-se a forma de identificar e rentabilizar os processos metabólicos, realizados por microrganismos, na produção de alimentos.

No 11º ano, na Unidade 5 - Crescimento e renovação celular - aborda-se a intervenção do Homem no ciclo celular e quais as consequências dessa intervenção para a saúde do indivíduo.

No 12º ano de Biologia, nas Unidades 3 e 4 - Imunidade e controlo de doenças e Produção de alimentos e sustentabilidade, respetivamente - abordam-se os processos biotecnológicos na produção de substâncias terapêuticas, como por exemplo os antibióticos, e na produção, melhoramento e conservação de alimentos.

No 12º ano de Geologia, no Tema III - Exploração e contaminação das águas e Que cenários para o século XXI? Mudanças ambientais, regionais e globais - aborda-se o tema da escassez de água doce utilizável pelo Homem e o sobrepovoamento terrestre.

Atualmente, as escolas enfrentam novos desafios relacionados com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico da nossa sociedade. A revolução recente na área da Genética levanta problemas éticos, nomeadamente no que diz respeito à manipulação genética de seres vivos. É pois necessária uma educação em Ciência que faculte aos alunos uma aprendizagem científica e tecnológica e que lhes permita uma maior possibilidade de tomar decisões informadas, de agir responsabilmente, bem como o de permitir o desenvolvimento de atitudes e valores.

Se por um lado, o ensino experimental é um requisito indispensável face à evolução científica e tecnológica que se tem verificado na área da biotecnologia, também é verdade que as atividades laboratoriais mais motivadoras são aquelas nas quais os alunos, guiados pelos seus professores, propõem a sua própria investigação. É, por isso, indispensável tratar problemas relevantes para os alunos inseridos em contextos sociais e tecnológicos de forma a dar sentido ao que aprende, fomentado a reflexão ética.

A capacidade de conceber, conduzir ou participar em projetos é, sem dúvida, uma competência da maior importância e deve constituir uma dimensão essencial na formação dos alunos de todos os níveis de ensino.

Nesta perspetiva, porque não fazer dos laboratórios de ensino locais de desenvolvimento de projetos de investigação? Foi nesse sentido que se desenvolveu este trabalho que apresenta um conjunto de atividades experimentais no âmbito C/T/S, passíveis de serem desenvolvidas nas escolas.

## 6. AVALIAÇÃO

A avaliação dos alunos deve ser efetuada de acordo com as opções tomadas. Se se pretende o desenvolvimento de atividades experimentais individuais pode-se solicitar aos alunos a elaboração de relatórios, posters ou panfletos organizados numa publicação em papel ou online.

No caso de se decidir desenvolver um projeto, focado num tema específico e em que são selecionadas um conjunto de atividades, é possível solicitar aos alunos a elaboração de um portefólio, por exemplo digital, que reflita todo o trabalho desenvolvido. Neste portefólio deverão ser incluídos os procedimentos desenvolvidos, as pesquisas efetuadas para a sua compreensão, o registo fotográfico ou outros resultantes das atividades e uma breve reflexão sobre o problema que se pretende estudar.

Em qualquer das opções o uso de grelhas de observação das atividades realizadas, em que se contemplem aspetos do domínio conceptual, procedimental e atitudinal dos alunos, são importantes.

O projeto pode concretiza-se num ou mais produtos, dependendo do interesse manifestado pelos alunos, podendo assumir várias formas: Página na Internet; *Blog*; Exposições; Palestras.



## 1. INTRODUÇÃO AO TRABALHO LABORATORIAL EM MICROBIOLOGIA

### 1.1 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

Em qualquer espaço laboratorial os procedimentos devem incluir o cumprimento de regras de funcionamento, de medidas de segurança obrigatórias e o manuseamento correto e cuidadoso do material, dos reagentes químicos e do equipamento laboratorial. Atender a estes princípios contribui para a prevenção de acidentes e para impedir a existência de fontes de contágio ou de perigo no local de trabalho.

A segurança num laboratório de microbiologia envolve implementação de procedimentos próprios, associados à manipulação de culturas microbianas. As reduzidas dimensões das células e a manipulação de um número elevado de células microbianas obriga a que sejam seguidas todas as precauções no sentido de evitar qualquer contaminação.

As normas de biossegurança que aqui se apresentam são um conjunto de ações que visam a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades realizadas no laboratório de microbiologia durante a realização de atividades experimentais. Estes riscos podem comprometer a saúde, o meio ambiente ou mesmo a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

#### 1.1.1 Comportamento e vestuário

- Utilizar sempre bata, para evitar sujar e contaminar a roupa.
- Reduzir ao mínimo os pertences pessoais e materiais na bancada de trabalho, mantendo o material ordenado.
- Limpar a bancada de trabalho com álcool etílico a 70% (v/v) antes e depois da realização dos trabalhos. Não se sabe qual o trabalho realizado anteriormente na bancada nem se deve deixar esta contaminada para quem trabalhar aí em seguida.
- Lavar as mãos no início e no final de cada sessão de trabalho experimental, assim evitar-se-á a contaminação fora do laboratório.
- Prender o cabelo comprido para evitar contactos com chama ou contaminação biológica.
- Comer ou beber no laboratório, roer unhas, lápis ou canetas e dedos na boca é proibido uma vez que leva a contaminações.
- Identificar todo o material utilizado.
- Conhecer e compreender o trabalho que se vai realizar, na dúvida de algum procedimento questionar o professor.
- Antes de abandonar o laboratório, verificar se todas as janelas se encontram devidamente fechadas e se todos os aparelhos (placas de aquecimento, autoclave, microscópios) se encontram desligados e os bicos de Bunsen ou lamparinas apagados.

#### 1.1.2 Riscos físicos

- Estabelecer regras para a arrumação e lavagem do material de vidro e de plástico no laboratório.

- Manusear com precaução materiais e aparelhos, mantendo-os devidamente limpos.
- Nunca usar aparelhos sem conhecer em pormenor o procedimento de utilização.
- Conhecer como se acende e apaga um bico de Bunsen e uma lamparina. Evitar o seu movimento enquanto estão acesos.
- Flamejar os materiais com cuidado, não aproximar material facilmente inflamável à chama, como é o caso do álcool.
- Na utilização do micro-ondas ter em atenção que as soluções aquecidas podem entrar em ebulição explosiva após agitação, provocando queimaduras graves.
- Vidros partidos devem ser removidos com auxílio de pinça ou luvas e colocados em contentores adequados.

### 1.1.3 Riscos químicos

- Nunca pipetar com a boca. Utilizar sempre os pipetadores.
- No manuseamento de compostos químicos considerados perigosos, evitar o contacto cutâneo ou a sua inalação, recorrendo ao uso de uma hotte, de luvas, máscara ou óculos de proteção, consoante as características dos compostos.
- Alguns reagentes químicos têm riscos associados, pelo que se deve prestar atenção às indicações fornecidas no produto e pelo professor.

### 1.1.4 Riscos biológicos

- Desinfetar a bancada de trabalho antes e depois de manipular microrganismos.
- Evitar levar as mãos à boca ou olhos.
- Colocar as pipetas de vidro sujas em contentores de plástico com uma solução com detergente e lixívia diluída (20%) devidamente identificados para esse fim.
- Deixar informação sobre os riscos de material de vidro sujo contendo soluções/suspensões, deixar informação sobre os riscos do conteúdo, de modo a ficar claro o procedimento para a sua eliminação.
- Colocar todo o material de vidro/plástico contendo suspensões de microrganismos no local indicado para posterior descontaminação.
- Não depositar no lixo comum material que tenha estado em contacto com bactérias.
- Colocar num local bem visível e acessível: os chuveiros (utilizados para uma primeira e rápida descontaminação), os extintores e o número do telefone do (s) funcionário (s) responsáveis e o número de emergência (112).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os microrganismos infecciosos podem ser agrupados em grupos de risco de acordo com a patogenecidade provável que apresentam para seres humanos e outros animais.

(<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>)

Esses grupos são os seguintes:

**Grupo de Risco 1:** nenhum ou baixo risco individual e coletivo. Um microrganismo que provavelmente não pode causar doença no homem ou num animal.

**Grupo de Risco 2:** risco individual moderado, risco coletivo baixo. Um agente patogénico que pode causar uma doença no homem ou no animal, mas que é improvável que constitua um perigo grave para o pessoal dos laboratórios, a comunidade, o gado ou o ambiente. A exposição a agentes infecciosos no laboratório pode causar uma infeção grave, mas existe um tratamento eficaz e medidas de prevenção, e o risco de propagação de infeção é limitado.

**Grupo de Risco 3:** alto risco individual, baixo risco coletivo. Um agente patogénico que causa geralmente uma doença grave no homem ou no animal, mas que não se propaga habitualmente de uma pessoa a outra. Existe um tratamento eficaz, bem como medidas de prevenção.

**Grupo de Risco 4:** alto risco individual e coletivo. Um agente patogénico que causa geralmente uma doença grave no homem ou no animal e que se pode transmitir facilmente de uma pessoa para outra, direta ou indiretamente. Nem sempre está disponível um tratamento eficaz ou medidas de prevenção.

O grau de risco dos microrganismos manipulados implica que um laboratório apresente características de conceção, estruturas de confinamento, equipamento, práticas e normas operacionais necessárias para trabalhar com agentes de diversos grupos de risco.

#### **Classificação de laboratório por grupo de risco da OMS:**

**Nível 1 de segurança biológica:** laboratório de base.

**Nível 2 de segurança biológica:** laboratório de base.

**Nível 3 de segurança biológica:** de confinamento.

**Nível 4 de segurança biológica:** confinamento máximo.



Figura 1. Símbolo internacional de risco biológico.

O símbolo internacional de risco biológico (Figura 3) deve estar exposto nas portas das salas onde se estão a manusear microrganismos do Grupo de Risco 2 ou superior.

Na tabela 1 apresenta-se a relação que se pode estabelecer entre os grupos de risco com níveis de segurança biológica e as práticas e equipamento que devem ser utilizados para manipular com segurança os microrganismos que neles se incluem (adaptação de <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>).

Tabela 1. Relação dos grupos de risco com níveis de segurança biológica, práticas e equipamento (adaptada da OMS).

| Grupos de risco | Nível segurança biológica | Práticas de laboratório  | Equipamento de proteção                                    |
|-----------------|---------------------------|--|--|
| 1               | Nível 1                   | BTM  | Nenhum, mesa/bancada de trabalho                           |
| 2               | Nível 2                   | BTM, fatos de proteção, sinal de perigo biológico  | Bancada de trabalho e CSB para potenciais aerossóis        |
| 3               | Nível 3                   | Igual ao nível 2, mais roupa especial, acesso controlado, ventilação dirigida              | CSB e outros dispositivos para todas as atividades         |
| 4               | Nível 4                   | Igual ao nível 3, mais entrada hermética, saída com duche, eliminação especial de resíduos | CSB classe III, fatos, autoclave, duas portas, ar filtrado |

BTM – Boas Técnicas de Microbiologia

CSB – Câmaras de segurança biológica.

## 1.2 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DE OBJETOS E DE CONTROLO DO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Os métodos utilizados para impedir o crescimento ou destruir microrganismos podem ser físicos ou químicos. Vários fatores podem condicionar a escolha do método a usar para esterilizar ou desinfetar com eficácia o material que se pretende utilizar. A natureza do material a descontaminar, as características e concentração dos microrganismos presentes, entre outros, são de ter em conta na escolha do método. Embora esterilização e desinfecção sejam termos usados muitas vezes como sinónimos para referir processos utilizados para destruir microrganismos, é importante que se distinga o seu significado.

**Limpeza** implica a remoção de sujidade e dos microrganismos. A lavagem com água e sabão remove a maior parte dos microrganismos e ainda as proteínas e outra matéria orgânica a qual, para além de constituir fonte de nutrientes para os microrganismos, protege-os contra a secagem e impede a ação de desinfetantes.

**Desinfecção** é o processo que destrói ou inativa microrganismos na forma vegetativa mas geralmente não afeta os esporos bacterianos. Os métodos utilizados podem ser físicos ou químicos.

**Esterilização** consiste na destruição e eliminação de todos os microrganismos na forma vegetativa e esporulada. Também aqui os métodos utilizados podem ser físicos e/ou químicos.

### 1.2.1 LIMPEZA

A limpeza é o pré-requisito essencial da descontaminação e pode constituir um método suficiente para artigos não-invasivos (baixo risco), mas não deve ser utilizado como o único processo para artigos de risco intermédio ou elevado, em que haja indicação para desinfecção ou esterilização.

· As indicações da limpeza passam pela descontaminação do ambiente (paredes, pavimentos, mobiliário), superfícies de trabalho e equipamentos, incluindo os dispositivos laboratoriais e outros objetos que entram em contacto com a pele intacta.

### 1.2.2 DESINFEÇÃO

· Para a desinfeção podem ser utilizados métodos físicos (calor) e químicos (desinfetantes químicos).

· A desinfeção pelo calor inativa todos os microrganismos com exceção dos esporos bacterianos, alguns vírus resistentes ao calor e o *Cryptosporidium*. Está indicado para os dispositivos que tolerem a exposição repetida ao calor húmido a temperaturas de cerca de 80°-90°C. Processa-se em máquinas de lavagem/desinfeção e têm a vantagem de permitir o controlo e validação do processo.

· Um desinfetante químico é um produto que é capaz de destruir microrganismos por meios químicos ou físico-químicos. Pode ser tóxico, inflamável, corrosivo ou apresentar outras incompatibilidades com os materiais.

· Os fatores que podem levar ao insucesso da desinfeção química incluem a resistência inata dos microrganismos, inativação devido à diluição ou contacto com outras substâncias (ex. matéria orgânica) e armazenamento inadequado.

No laboratório, o uso de desinfetantes está indicado para descontaminação de superfícies de trabalho (álcool a 70 % ou hipoclorito 1.000 ppm), para os recipientes de material contaminado - pipetas, ansas, etc. (hipoclorito 5.000 ppm) e para remoção de matéria orgânica vertida (hipoclorito 10.000 ppm) Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

### 1.2.3 ESTERILIZAÇÃO

#### 1.2.3.1 Esterilização pelo calor húmido

· É o meio mais seguro para a destruição de todas as formas microbianas através do contacto direto com o vapor dando origem à desnaturação proteica.

O seu poder de ação está baseado em dois fatores: humidade e calor numa câmara de conceção adequada - o autoclave (Figura 2).

Figura 2. Autoclave.



| Temperatura | Tempo      | Humidade relativa |
|-------------|------------|-------------------|
| 134°C       | 3 minutos  | 100 %             |
| 121°C       | 15 minutos | 100 %             |

Tabela 2. Valores comumente usados no autoclave.

· Durante a esterilização, os frascos devem permitir o fluxo de vapor. Os frascos/balões são colocados em prateleiras ou cestos de rede ou contentores perfurados para permitir a saída de ar por deslocação para baixo. Para ser eficaz devem ser utilizados pequenos volumes de líquido.

Para os meios de cultura deve-se proceder a um arrefecimento lento para evitar a fervura e o extravasamento

### 1.2.3.2 Esterilização pelo calor seco

#### . Estufa

· O calor seco, menos vulgarizado como processo de esterilização é preferencialmente utilizado para materiais de vidro.



| Temperatura | Tempo       |
|-------------|-------------|
| 160°        | 120 minutos |
| 170°        | 60 minutos  |
| 180°        | 30 minutos  |

Tabela 3. Parâmetros comumente usados nas estufas.

Figura 3. Estufa

· As vantagens deste método são a boa capacidade de penetração e a não corrosão dos materiais. São desvantagens a necessidade de temperaturas elevadas, exposição prolongada e a penetração heterogénea.

#### . Chama

· Limitada às ansas de inoculação, aos espalhadores e agulhas, que podem ser previamente mergulhados em álcool.

· As práticas de “passar à chama” instrumentos, rolhas, bocais dos frascos ou tubos de cultura é um método eficaz de esterilização (Figuras 4 e 5). No entanto, não se assegura a sua esterilização ou proteção contra contaminantes ambientais porque não se atinge uma temperatura suficientemente elevada e o tempo de exposição é demasiado curto.



Figura 4. Esterilização de uma ansa de inoculação. Figura 5. Flamejção do gargalo de um frasco

### 1.2.4 FILTRAÇÃO

A filtração difere dos outros métodos de esterilização porque não envolve a destruição de microrganismos, mas sim a sua remoção através da passagem por filtros.

- Os líquidos ou gases atravessam superfícies filtrantes com poros de dimensões insuficientes para permitirem a passagem de microrganismos, que aí ficam retidos.

- Os filtros de membrana são utilizados para esterilizar soluções e para concentrar organismos de grandes volumes de amostras, como acontece na análise bacteriológica das águas.

- Filtros de elevada eficiência para partículas existentes no ar são incorporados em câmaras de fluxo laminar (Figura 6), permitindo a retenção de 99,9% das partículas no ar que o atravessa.

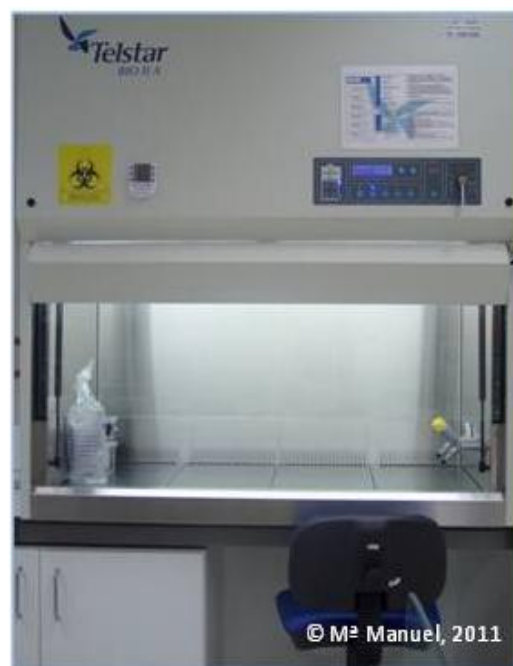


Figura 6. Câmara de fluxo laminar.

### 1.2.5 RADIAÇÕES

As radiações são muito úteis para a esterilização de espaços, de salas, de instrumentos e de materiais que não suportam as temperaturas exigidas pelas técnicas do calor.

- Radiações de elevada energia destroem células vivas, incluindo microrganismos. As radiações mais vulgarmente utilizadas são os raios ultravioletas.



· As radiações ultravioleta (UV) impedem a replicação por alteração das ligações duplas entre timinas da mesma cadeia de DNA, originando mutações letais. Como têm baixo poder de penetração, apenas são utilizadas na esterilização de superfícies para a manutenção de ambientes assépticos. Deve ter-se sempre presente que a lâmpada UV só deve estar ligada na ausência de pessoas no laboratório.

## 1.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL DE LABORATÓRIO

### 1.3.1 Material para fazer meios de cultura

Muitos dos estudos em microbiologia dependem da capacidade de conseguir manter e fazer crescer microrganismos em laboratório, o que só é possível devido à existência de meios de cultura com diferentes características. Um meio de cultura serve para fazer crescer, transportar e armazenar os microrganismos. Estes devem, por isso, conter todos os nutrientes necessários ao seu crescimento dos microrganismos.

Meios de cultura específicos são essenciais para o isolamento e identificação de microrganismos, o teste de sensibilidade a antibióticos, análise a alimentos e água, na microbiologia industrial, e outras atividades. Embora todos os microrganismos necessitem de fontes de energia, carbono, azoto, fósforo, enxofre, e outros minerais, a composição ideal de um meio depende da espécie que se pretende cultivar, pois os requisitos nutricionais podem variar muito de espécie para espécie. Por isso, o conhecimento do habitat normal do microrganismo é útil na seleção do meio de cultura apropriado, porque os seus requisitos nutricionais refletem o seu ambiente natural.

Um meio de cultura pode ser sólido (com 1,5% de agar), líquido ou semi- sólido (com 0,5% de agar).

Na Figura 7 é apresentado o material necessário para a preparação dos meios de cultura.



#### Legenda

- 1-Meio de cultura comercial
- 2- Água esterilizada
- 3- Proveta
- 4- Gobelé
- 5- Matraz / Erlenmeyer
- 6- Frascos
- 7- Barra magnética
- 8- Espátulas
- 9- Caixas de Petri
- 10-Caixas de Petri com meio

Figura 7. Materiais necessários para preparar meios de cultura.

Maria Manuel Azevedo Gomes



### 1.3.1.1 Descrição de alguns meios de cultura básicos num laboratório de microbiologia

De acordo com a sua função e composição, os meios de cultura classificam-se com sendo não seletivos; seletivos; diferenciais; e de enriquecimento.

**Não seletivos:** servem para fazer crescer indiferenciadamente microrganismos não fastidiosos com características diversas. Exemplo: NA (nutriente agar); LB (Luria-Bertani).

**Seletivos:** inibem o desenvolvimento de determinados microrganismos, permitindo o crescimento de outros. Exemplos: Slanetz & Bartley, Karmali, Salmonella & Shigella.

**Diferenciais:** permitem estabelecer diferenças entre microrganismos com características semelhantes. Exemplos: Agar MacConkey (também é seletivo), Agar sangue, Agar Baird-Parker.

**Enriquecimento:** estimulam o crescimento de microrganismos em número reduzido ou de crescimento lento, e de microrganismos exigentes e fastidiosos. Exemplos: Rappaport-Vassiliadis, Bolton Broth.

**Pré-enriquecimento:** permitem a dessensibilização de microrganismos metabolicamente fragilizados. Exemplo: Água peptonada.

#### **Alguns exemplos de meios de cultura utilizados rotineiramente incluem:**

**Agar MacConkey:** meio seletivo que contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias não entéricas. Também é um meio diferencial pois contém lactose e um indicador de pH. As bactérias capazes de fermentar a lactose (coliformes) provocam uma diminuição no pH, que se manifesta pelo aparecimento de colónias de cor avermelhada. Pelo contrário, as bactérias incapazes de fermentar a lactose formam colónias de cor brancas/amareladas (não-coliformes).

**Agar Manitol sal:** meio seletivo para *Staphylococcus*. A elevada concentração de cloreto de sódio (7,5%) inibe o crescimento dos restantes microrganismos, com a exceção das bactérias halotolerantes. As bactérias fermentadoras do manitol originam a formação de um halo amarelo em torno das colónias.

**Agar Slanetz-Bartley:** meio seletivo para enterococos. Inibe o crescimento das bactérias Gram-negativas devido à presença de azida sódica. Os enterococos reduzem o TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazolio) produzindo um precipitado roxo que dá uma cor avermelhada às suas colónias. Meio sensível ao calor e por isso não deve ser autoclavado.

**Agar nutriente:** meio económico para o cultivo de microrganismos pouco exigentes em nutrientes. Normalmente contém peptona, extrato de levedura ou de carne, cloreto de sódio e agar.

**Agar Salmonella & Shigella:** meio seletivo para o cultivo de *Salmonella* e *Shigella*. Contém sais biliares, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas. A presença de lactose permite distinguir as bactérias que são ou não capazes de fermentar este açúcar. A presença de vermelho neutro (indicador de pH) indicará a existência de bactérias fermentadoras de lactose através da cor vermelha apresentada pelas suas colónias. *Salmonella* e *Shigella* exibirão colónias transparentes, uma vez que não são capazes de

fermentar a lactose. O precipitado de cor preta exibido por colónias de *Salmonella* deve-se ao tiosulfato de sódio e citrato de ferro presentes no meio de cultura.

**Agar Mueller-Hinton:** meio recomendado para o teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método da difusão em agar.

**Água peptonada:** meio de enriquecimento para *Salmonella*. Os sais incorporados neste meio mantêm o pH constante, o que também permite a recuperação de bactérias danificadas.

**Agar nutriente com MUG:** usado para detetar *Escherichia coli* ou outras bactérias glucuronidasas positivas com base na fluorescência. A maioria das estirpes de *E. coli* possuem a enzima  $\beta$ -glucuronidase e, por isso, hidrolisam o ácido 4-metilumbeliferil $\beta$ -D-glucorónico (MUG) em 4-metilumbeliferona, um produto fluorescente quando expostos à luz UV de elevado comprimento de onda (360 nm).

Na Figura 8 apresentam-se exemplos de meios de cultura já preparados.



Figura 8. Exemplos de meios de cultura em frascos e caixas de Petri.

### 1.3.2 Material de filtração de amostras de água

Um dos principais métodos de isolamento de microrganismos presentes na água é o método de filtração por membrana.

A técnica de filtração por membrana consiste na filtração de um volume de amostra de água (100 ml e 1000 ml) através de uma membrana filtrante, com porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  ou 0,2  $\mu\text{m}$ , que retém as bactérias. Por aplicação de vácuo, a água passa pela membrana ficando assim retidas as bactérias na membrana, que é posteriormente transferida diretamente para os meios de cultura seletivos ou para meios de enriquecimento. As colónias formadas são contadas 24 a 48 horas após a incubação, fazendo-se uma estimativa da densidade de bactérias na amostra inicial de água, expressa em unidades formadoras de colónias, UFC, por volume de água filtrado.

Na Figura 9 apresentam-se os materiais utilizados no isolamento de microrganismos presentes em amostras de água através do método de filtração por membrana.



### Legenda

- 1- Sistema de filtração
- 2- Proveta
- 3- Frasco de 500ml
- 4- Bomba de vácuo
- 5- Caixas de membranas
- 6- Membranas (0,2 e 0,45  $\mu\text{m}$ )
- 7- Pinça
- 8- Caixa de Petri (com filtro)
- 9- Saco hermético
- 10- Caixa saquetas geradoras de  $\text{CO}_2$
- 11- Saqueta geradora de  $\text{CO}_2$

Figura 9. Materiais usados para filtrar amostras de água.

### 1.3.3 Material de microscopia

Os microrganismos possuem dimensões muito reduzidas, pelo que a sua visualização requer o uso de microscópio (Figura 10). O recurso à coloração e a técnicas de fixação do material biológico constituem duas etapas essenciais para a visualização de microrganismos.

### Legenda

- 1- Microscópio
- 2- Tubos cónicos volumétricos
- 3- Tina de coloração
- 4- Corantes
- 5- Lamparina
- 6- Lamelas
- 7- Lâminas
- 8- Ansa de inoculação
- 9- Óleo de imersão



Figura 10. Exemplos de materiais usados em microscopia.

### 1.3.4 Material para realização do teste suscetibilidade a antibióticos

A determinação da sensibilidade à terapêutica antibiótica é hoje fundamental, devido ao aumento cada vez maior de estirpes bacterianas resistentes a alguns antibióticos que, devido a isso, deixam de ser eficazes no tratamento de infeções.

Para avaliar *in vitro* a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos podem usar-se o Método de Diluição e o Método de Difusão que inclui a técnica de Kirby-Bauer e o *Epsilon Test*.

A técnica de Kirby-Bauer consiste na sementeira de uma cultura bacteriana no meio de cultura Mueller-Hinton (sólido), seguida da aplicação de discos de papel impregnados com diferentes antibióticos de concentração conhecida. O *Epsilon Test* é também um método de difusão em agar que permite avaliar a concentração mínima inibitória (CMI) de cada antibiótico contra a cultura bacteriana em estudo. Nesta técnica usam-se tiras impregnadas com um gradiente de concentração do antibiótico a testar.

Na Figura 11 apresentam-se os materiais necessários para proceder à avaliação da suscetibilidade bacteriana a antibióticos através do Método de Difusão.

#### Legenda

- 1- Meio Mueller-Hinton líquido
- 2- Tubos cónicos volumétricos
- 3- Meio Mueller-Hinton sólido
- 4- Micropipeta
- 5- Pontas para micropipetas
- 6- Tiras de antibiótico
- 7- Discos de antibiótico
- 8- Pinça
- 9- Exemplo de teste Epsilon
- 10- Exemplo de teste de Kirby-Bauer
- 11- Placas com meio Mueller-Hinton sólido

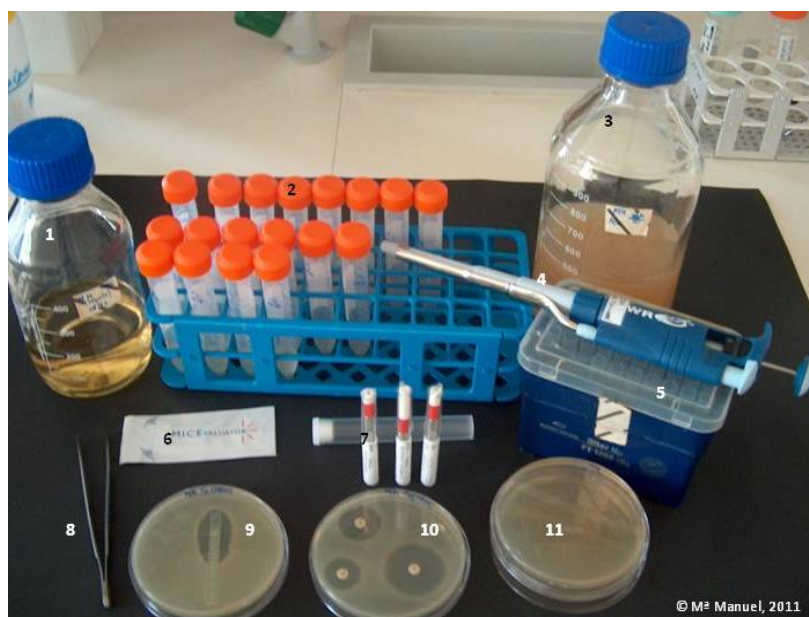


Figura 11. Material necessário para o teste de suscetibilidade a antibióticos, pelo método de difusão.

### 1.3.5 Material de desinfeção/ esterilização

A desinfeção e esterilização do material e local de trabalho são essenciais em qualquer laboratório e, num laboratório de microbiologia ainda mais. A manipulação de microrganismos fora do seu habitat natural e o uso de meios de cultura que promovem o seu crescimento, associados ao facto de alguns microrganismos apresentarem uma dose de infectividade alta, faz com que o trabalho num laboratório de microbiologia tenha de ser rodeado de medidas de desinfeção muito cuidadosas. O uso de bata, a lavagem



frequente das mãos e desinfecção da bancada de trabalho são exemplos de medidas simples para impedir a contaminação.

A Figura 12 permite observar alguns exemplos de material básico utilizado na desinfecção e prevenção de contaminação



#### Legenda

- 1- Hipoclorito de sódio 10% (lixívia)
- 2- Álcool etílico 70%
- 3- Parafilme
- 4- Mangas para esterilização
- 5- Papel higiênico
- 6- Fita indicadora de esterilização
- 7- Papel de estanho
- 8- Luvas descartáveis

Figura 12. Materiais básicos para desinfecção.

### 1.3.6 Outro material de laboratório

Em qualquer laboratório podem-se encontrar um conjunto de materiais e aparelhos comuns (Figuras 13 a 14).



Figura 13. Frigorífico



Figura 14. Banho termóstático



Figura 15. Estufa com agitação

O **banho termóstático** (Figura 14) é também um aparelho essencial pois permite controlar a temperatura para valores adequados ao crescimento dos microrganismos. Apresenta a desvantagem de só poder ser usado para culturas em meio líquido.

As **estufas** (Figura 15) servem para o crescimento de microrganismos tanto em meio sólido como em meio líquido. As que apresentam agitação facilitam o arejamento das culturas importantes para o crescimento de microrganismos aeróbios.

Na figura 16 apresentam-se alguns materiais de uso comum num laboratório.



Figura 16. Alguns materiais comuns num laboratório.

### Legenda

|                               |                         |                           |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1- Esguicho                   | 10- Proveta             | 19- Espalhadores de vidro |
| 2- Micropipetas               | 11- Balão de vidro      | 20- Pipeta Pasteur        |
| 3- Tubos de cultura           | 12- Matraz / Erlenmeyer | 21- Ansa de inoculação    |
| 4- Tubos cónicos volumétricos | 13- Gobelé              | 22- Espátulas variadas    |
| 5- Pontas para micropipetas   | 14- Vareta de vidro     | 23- Bisturi               |
| 6- Microtubos                 | 15- Barra magnética     | 24- Tesoura               |
| 7- Caixas de Petri            | 16- Palitos             | 25- Lamparina             |
| 8- Termómetro                 | 17- Seringa e agulhas   | 26- Marcador para vidro   |
| 9- Frasco de cultura          | 18- Pinça               |                           |

## 1.4 REGISTOS DE LABORATÓRIO

No decorrer da execução do trabalho experimental devem-se registar todas as ocorrências e resultados das atividades. Sugere-se o uso de um caderno que servirá para o registo de todas as informações consideradas pertinentes para elaboração de um relatório ou eventual repetição da atividade.

Um relatório de uma atividade experimental deverá relatar de forma completa o procedimento executado e os resultados obtidos. Além disso o seu autor deve elaborar um documento compreensível para quem o vai ler e permitir a repetição da atividade por outros. Para a elaboração de um relatório sugere-se o seguinte modelo:

**Título** - que identifique a atividade desenvolvida.

**Autor (es)** - que realizaram o trabalho (exemplo: Gomes, M. *baiaogomes567@hotmail.com*)

**Resumo** - pequeno texto em que constem os resultados obtidos e as conclusões tiradas.

**Objetivo** - o que se pretende com o trabalho realizado.

**Introdução** - conhecimentos que justificam o enquadramento da atividade.

**Palavras-chave** - termos diretamente relacionados com a atividade.

**Material e reagentes** - listagem de todo o material utilizado, desde equipamentos, reagentes e outro material.

**Protocolo experimental** - procedimento de toda a atividade, com referência a eventuais alterações do procedimento recomendado.

**Resultados** - registo das observações efetuadas.

**Discussão** - comentários críticos dos resultados obtidos.

**Conclusão** - descrição do cumprimento ou incumprimento dos objetivos propostos para a atividade.

**Comentário** - comentário global da atividade com recomendações consideradas relevantes.

**Bibliografia** - referências consultadas ou utilizadas na realização do trabalho.

## 1.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS

O nosso ambiente está repleto de microrganismos, que se encontram em todo o lado: no ar, no solo, na água, na comida, nas superfícies corporais, nos esgotos, entre outros.

Para estudar os microrganismos é necessário proceder à separação de populações mistas, de modo a obter culturas puras, formadas por uma única linha celular. Para o isolamento e estudo de microrganismos são necessários equipamentos laboratoriais e a aplicação de técnicas específicas.

Nesta secção, serão abordadas resumidamente as técnicas laboratoriais básicas para desenvolver as atividades práticas propostas com sucesso. Na descrição de cada técnica inclui-se também o procedimento experimental a implementar.

### 1.5.1 Meios de cultura

Para cultivar microrganismos em laboratório é necessário fornecer-lhes as condições mais adequadas para o seu crescimento. Existem diversos tipos de meios de cultura, que contêm diferentes quantidades e tipos de nutrientes tornando possível a multiplicação de diferentes tipos de microrganismos em laboratório. A pesquisa de microrganismos, nomeadamente de bactérias, nas atividades propostas, vai depender dos meios de cultura que o laboratório dispõe.

O procedimento para preparar os meios de cultura é muito importante para obter culturas bem sucedidas, devendo ser seguidas escrupulosamente as indicações de cada fabricante.

#### PROTOCOLO 1. Preparação e distribuição de um meio de cultura

- 1- Pesar a quantidade de meio necessário para preparar o volume indicado, seguindo as instruções da embalagem;
- 2- Medir o volume necessário de água destilada numa proveta e transferir para um frasco de cultura o meio de cultura pesado e a água destilada;
- 3- Agitar numa placa de aquecimento até obter uma solução límpida;
- 4- Tapar o frasco com a rolha de algodão e papel de alumínio;
- 5- Caso seja necessário, colocar o frasco com o meio de cultura a esterilizar na autoclave <sup>1</sup>;
- 6- Arrefecer até atingir uma temperatura que permita o seu manuseamento;
- 7- Verter o meio de cultura para as caixas de Petri em condições de assepsia, fazendo uma camada de aproximadamente 5 mm;
- 8- Deixar solidificar e depois identificar com o nome do meio de cultura e a data da sua elaboração;
- 9- Inverter as placas e guardar no frigorífico.

<sup>1</sup> Na ausência do autoclave pode utilizar-se uma panela de pressão na esterilização de meios de cultura, contidos em frascos. Os frascos devem conter até ao máximo de dois terços da sua capacidade. Devem ser rolhados com algodão cardado e proteger-se com papel de estanho ou de embrulho atado com cordel. No caso de terem rolha de enroscar, a rolha não deve ficar muito apertada, de modo a permitir o equilíbrio das pressões durante a esterilização.

#### Preparação do meio de cultura não comercial

- 1- Colocar um bocado de carne num litro de água destilada deixando-se ferver durante 5 minutos;
- 2- Filtrar e adicionar, cuidadosamente, 15 g de agar;
- 3- Ferver mexendo sempre com a vareta de vidro até dissolver completamente o agar;
- 4- Distribuir o meio de cultura, ainda quente, pelas placas de Petri esterilizadas;
- 5- Manter as placas tapadas e deixar arrefecer até o meio de cultura solidificar.



### 1.5.2 Cultura e isolamento de microrganismos

A cultura e o isolamento de microrganismos são dois procedimentos essenciais em microbiologia. O crescimento de populações microbianas em meios de cultura no laboratório, permite a obtenção de culturas puras (contêm apenas um tipo de microrganismo) ou de culturas mistas (contêm mais do que um tipo de microrganismo). O isolamento permite a separação de um microrganismo a partir de populações mistas.

### PROTOCOLO 2. Cultivo de microrganismos

Os microrganismos estão presentes em qualquer local, no ar, na água, nos alimentos e nos objetos que manipulamos diariamente. Para se obter uma suspensão com microrganismos podemos recorrer, por exemplo, às infusões.

- 1- Preparar uma infusão de batatas ou outro qualquer vegetal com antecedência de 5 dias;
- 2- Com uma ansa, recolher uma pequena porção da película formada na superfície da infusão;
- 3- Espalhar a película no meio de cultura escolhido;
- 4- Colocar parafilme para isolar a caixa de Petri;
- 5- Incubar, em posição invertida, para evitar a evaporação, numa estufa a 35°C durante 1 a 2 dias.

O isolamento de um determinado microrganismo em cultura pura a partir de uma população mista envolve o recurso a técnicas de isolamento de colónias. Estas técnicas permitem obter colónias individualizadas e espacialmente separadas que, teoricamente, são originadas a partir de uma única célula, correspondendo, por isso, a uma cultura pura de um determinado microrganismo.

Para obter culturas puras utilizam-se os seguintes métodos:

**1. Método das estrias ou de riscado em placa** (Figura 17): é um método de isolamento bastante rápido. Consiste na diluição de uma pequena porção de inóculo, colhida com uma ansa, a qual é sucessivamente riscada na superfície de um meio de cultura sólido. A execução do riscado pode ser feita por vários processos.

O objetivo do riscado é a obtenção de uma colónia a partir de uma única célula inicial. Durante o processo de esgotamento do inóculo, deve esterilizar-se a ansa entre os riscados 1, 2, 3 e 4, arrefecendo a ansa antes de iniciar o riscado seguinte.

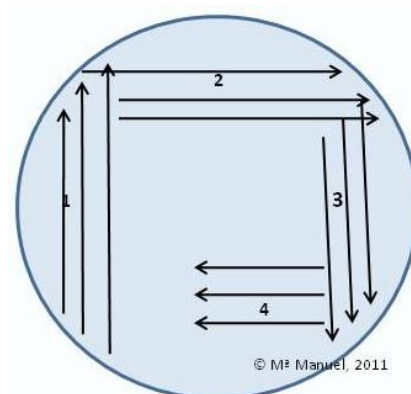


Figura 17. Riscado em placa

**2. Método das diluições sucessivas** (Figura 18): consiste na realização de diluições sucessivas da amostra e posterior sementeira de quantidades conhecidas das mesmas em caixas de Petri. A sementeira consiste na distribuição uniforme do inóculo num meio de cultura.

Ambos os métodos, das estrias e das diluições sucessivas, pretendem o isolamento de uma população bacteriana a partir de uma única célula inicial.

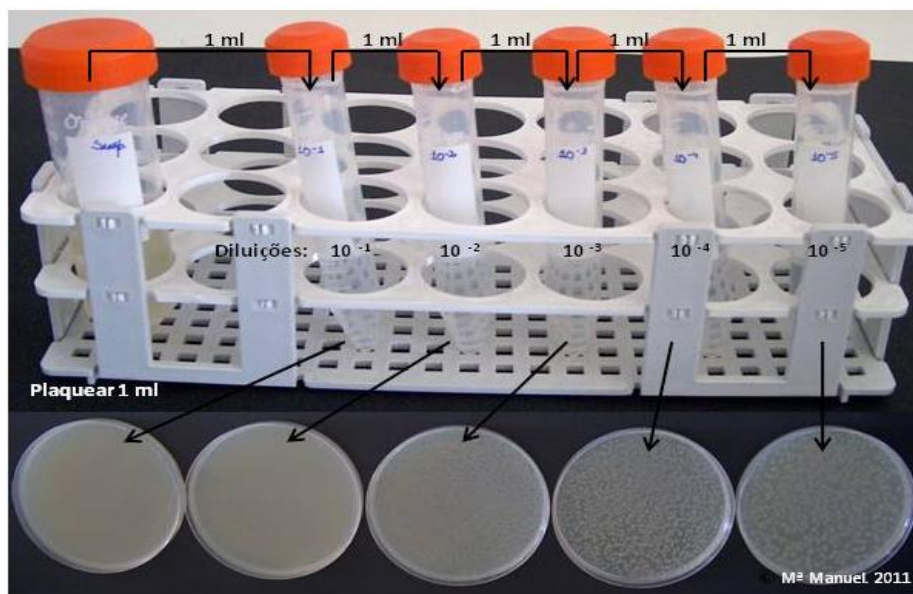


Figura 18. Método das diluições sucessivas.

### PROTOCOLO 3. Isolamento por riscado em placa

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e retirar uma ansada da cultura a isolar (Protocolo 3);
- 3- Espalhar uma porção de cultura, riscando a superfície da placa (Figura 19), evitando danificar a superfície do agar;
- 4- Incubar as placas em posição invertida à temperatura ambiente, durante 24/48 horas.
- 5- Observar as placas e registar a existência de colónias isoladas.

Se estiverem completamente dispersas, as colónias correspondem à multiplicação de uma bactéria inicial e designam-se de Unidade Formadoras de Colónias (UFC). Se os microrganismos estiverem agregados não há correspondência entre o número de colónias obtido e o número inicial de microrganismos.

### PROTOCOLO 4. Isolamento por diluições sucessivas

- 1- Identificar os tubos de ensaio com  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;
- 2- Adicionar 9 ml de água esterilizada a cada tubo cónico volumétrico;
- 3- Com uma pipeta estéril de 1 ml ou usando uma micropipeta com pontas estéreis, retirar 1 ml da suspensão já preparada (a partir do Protocolo 2);

- 4- Introduzir o volume de 1ml da suspensão no primeiro tubo de diluição ( $10^{-1}$ ), agitando por inversão a suspensão;
- 5- Com uma nova pipeta estéril retirar 1 ml da diluição  $10^{-1}$  e transferir para outro tubo para obter a diluição  $10^{-2}$ ;
- 6- Repetir este procedimento até obter a diluição  $10^{-5}$ .

#### Inoculação da cultura de leveduras por espalhamento no meio de cultura

- 7- Identificar as caixas de Petri na parte marginal da sua base com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, diluição, data do ensaio, identificação do grupo de trabalho;
- 8- Selecionar as três últimas diluições da suspensão  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  e agitar vigorosamente cada um dos tubos de ensaio;
- 9- Colocar 1 ml de cada uma das três diluições nas caixas de Petri contendo o meio de cultura;
- 10- Mergulhar o espalhador no copo contendo etanol absoluto e passar na chama do bico de Bunsen ou da lamparina. Deixar a chama apagar no espalhador e esperar até ele arrefecer;
- 11- Passar o espalhador sobre a superfície do meio de cultura, mantendo o espalhador numa posição vertical. Retirar o excesso de suspensão;
- 12- Incubar as caixas de Petri à temperatura ambiente, durante 24/48 horas;
- 13- Observar as placas e registar a existência de colónias isoladas (UFC).

#### 1.5.3 Manutenção de culturas de microrganismos

Após a obtenção de uma cultura pura, a sua manutenção em laboratório deve garantir que os microrganismos permaneçam viáveis, geneticamente homogêneos e protegidos de posteriores contaminações. As culturas podem ser mantidas por refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ), congelação ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em azoto líquido:  $-180^{\circ}\text{C}$ ) ou liofilizadas. Para conservação por congelação a longo prazo deverão usar-se substâncias crioprotectoras (e.g. glicerol).

Para retirar um novo inóculo a partir de uma cultura crio-preservada basta remover um pouco da cultura, por exemplo com um palito estéril, e repicar para uma placa de Petri com o meio de cultura adequado.

Na Figura 19 é apresentado algum material necessário à manutenção de culturas de microrganismos.

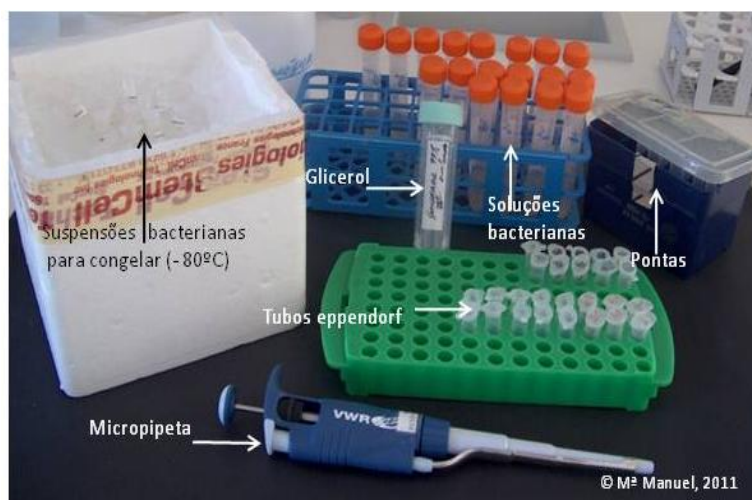


Figura 19. Material necessário para a manutenção de culturas microbianas.

### 1.5.4 Observação de bactérias

Na descrição de microrganismos é importante ter em conta as características morfológicas do seu crescimento. A morfologia de uma colónia isolada na superfície de agar deve ser observada quanto ao seu tamanho, à cor, à forma, à elevação, à margem, ao aspeto da superfície, ao brilho, à opacidade e à sua consistência (Figura 20).


















|          |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|
| FORMA    | Punctiforme   | Circular  | Filamentosa   | Irregular   | Rizoide   | Lenticular  |
|          |    |    |    |    |     |    |
| ELEVACÃO | Achatada  | Elevada   | Convexa   | Pulvinada   | Umbiculada  |   |
|          |    |    |    |  |    |   |
| MARGEM   | Inteira   | Ondulada  | Filamentosa   | Lobulada  | Serrada   | Enrugada  |
|          |  |  |  |  |  |  |

Figura 20. Características morfológicas das colónias de bactérias

([http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book\\_id=3&fig\\_number=4&chap\\_number=7](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=4&chap_number=7))

### PROTOCOLO 5. Caracterização de colónias

- 1- Observar atentamente à lupa binocular as colónias das caixas de Petri, sem abrir as caixas;
- 2- Descrever as características morfológicas das colónias em relação ao tamanho (medir o diâmetro da colónia com uma régua); à cor; à forma; à margem; à elevação; à superfície-textura (lisa/rugosa); ao brilho (brilhante/mate); à opacidade (transparente/opaca) e à consistência (viscosa/granulosa).

Para a observação de microrganismos vivos pode recorrer-se a preparações a fresco. Este tipo de preparações permite, por exemplo, observar a existência ou não de mobilidade.

A observação de bactérias em preparações não coradas é difícil e por isso recorre-se a corantes. Estes permitem aumentar o contraste entre as células e o meio e observar estruturas particulares, como a parede celular e o material genético. A coloração simples e a coloração diferencial (método de Gram) são as duas técnicas realizadas.

Na coloração simples aplica-se um único corante (por exemplo, azul de metileno) sobre o esfregaço durante um tempo específico. As células coram de um modo uniforme.

Na coloração diferencial aplica-se mais de que um corante e reagente. Uma das técnicas de coloração diferencial muito utilizada em bacteriologia é o método de Gram, este método permite diferenciar bactérias com base nas características da sua parede celular em Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas, que retêm o corante violeta cristal e apresentam coloração violeta enquanto que as bactérias Gram-negativas, que não retêm o corante violeta cristal e são coradas pela safranina apresentando coloração vermelha. Ambas as células bacterianas são coradas com violeta cristal (cor azul-violeta) seguido pelo mordente (lugol) que forma com o corante violeta cristal um complexo intracelular. Este complexo é removido pelo etanol nas bactérias Gram-negativas mas permanece nas bactérias Gram-positivas. Nas bactérias Gram-negativas o peptidoglicano (constituente de todas as paredes celulares bacterianas) é menos espesso do que nas bactérias Gram-positivas, permitindo a passagem desse complexo e a sua posterior coloração vermelha quando utilizado o corante safranina.

A capacidade das células reterem ou perderem o corante reflete diferenças na estrutura fundamental da parede celular, pelo que a resposta à coloração de Gram é uma característica taxonómica importante, usada na identificação das bactérias.

#### **PROTOCOLO 6. Coloração simples**

- 1- Colocar uma gota de água destilada esterilizada na lâmina;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e deixar arrefecer;
- 3- Retirar uma ansada proveniente de uma cultura de uma atividade anterior e suspender o material na gota de água;
- 4- Espalhar o líquido numa pequena área, esfregando bem de forma a separar a massa de células e depois colocar uma lamela;
- 5- Colocar um corante básico (e.g. azul de metileno) utilizando a técnica da irrigação;
- 6- Observar ao microscópio.

#### **PROTOCOLO 7. Coloração de Gram**

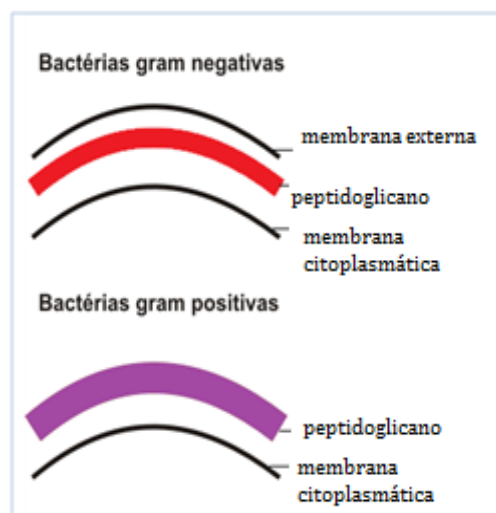
- 1- Colocar uma gota de água destilada e esterilizada na lâmina;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e deixar arrefecer;
- 3- Retirar uma ansada de uma cultura e suspender o material biológico na gota de água;
- 4- Espalhar a suspensão numa pequena área da lâmina, esfregando bem de forma a separar a massa de células;
- 5- Segurar a lâmina com uma pinça e passar rapidamente sobre a chama para evitar sobreaquecimento até toda a água evaporar e fixar o material biológico;
- 6- Inundar o esfregaço fixado com violeta cristal (corante primário) agitando suavemente durante cerca de 1 minuto;

- 7- Lavar com água corrente, começando na extremidade da lâmina e deixando escorrer com cuidado por cima do material fixado;
- 8- Inundar novamente o esfregaço agora com solução de lugol (mordente) deixando atuar durante 1 minuto (vai-se formar um complexo insolúvel com o violeta cristal);
- 9- Lavar novamente com água corrente e secar agitando ou utilizando cuidadosamente papel de filtro;
- 10- Inundar o esfregaço com etanol 95 % (agente descolorante), agitando suavemente durante 1 minuto;
- 11- Inundar novamente com safranina, como corante contrastante (vermelho), durante 30 segundos, lavar e secar com papel de filtro;
- 12- Observar ao microscópio, registrando se as células são Gram-positivas ou Gram-negativas, a sua forma e a sua dimensão.

Nas bactérias Gram-negativas, o etanol remove os lípidos da membrana externa da parede celular (Figura 21), aumentando a sua permeabilidade; o complexo violeta cristal-iodo pode assim ser extraído, descorando as bactérias que podem ser coradas com a safranina, de cor **vermelha**.

Nas bactérias Gram-positivas, o tratamento com etanol resulta na sua desidratação, com redução da permeabilidade da parede de peptidoglicano, mais espessa do que as Gram-negativas e consequente retenção do complexo violeta de cristal-iodo, mantendo-se assim a cor do primeiro corante, coloração **azul/violeta**.

Figura 21. Representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



### 1.5.5 Relação dos microrganismos com o oxigénio

Os microrganismos apresentam várias respostas à presença de oxigénio: os **aeróbios obrigatórios**, que necessitam de oxigénio para crescerem; os **anaeróbios obrigatórios**, que não precisam do oxigénio além de que este é tóxico, matando ou inibindo o seu crescimento; os **anaeróbios facultativos**, que podem permutar entre tipos de metabolismo aeróbios e anaeróbios. Sob condições anaeróbias (ausência de O<sub>2</sub>) crescem por fermentação ou respiração anaeróbia, mas na presença de oxigénio realizam a respiração aeróbia; os **anaeróbios aerotolerantes**, que são indiferentes à presença de oxigénio e possuem um metabolismo exclusivamente anaeróbio e os **microaerófilos**, que requerem oxigénio para se multiplicarem mas em baixas concentrações, caso contrário elevadas concentrações de O<sub>2</sub> têm um efeito inibitório no seu crescimento. A resposta de um organismo ao oxigénio presente no seu ambiente depende de estes possuírem enzimas que reagem com o oxigénio e vários radicais de oxigénio que são formados pelas células na presença do oxigénio.



Nos aeróbios e anaeróbios aerotolerantes a potencial acumulação letal de superóxido é evitada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Todos os microrganismos que conseguem viver na presença de oxigénio (quer o utilizem ou não no seu metabolismo) possuem a enzima superóxido dismutase. Para além da SOD quase todos os organismos possuem enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Certas bactérias anaeróbias aerotolerantes, como as bactérias produtoras de ácido láctico, embora não possuam a enzima catalase, decompõem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  através de peroxidases.

Os anaeróbios obrigatórios, que não apresentam enzimas superóxido dismutases e catalases e/ou peroxidases, sofrem oxidações letais por vários radicais de oxigénio quando expostos ao oxigénio.


### PROTOCOLO 8. Constatar a atividade das enzimas catalase e citocromo oxidase

- 1- Com a ponta de uma pipeta de Pasteur ou com palito, transferir a colónia em estudo para a lâmina de vidro;
- 2-Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 10% e observar imediatamente se existe ou não formação de bolhas de ar. Se existir a reação é positiva.
- 3- Colocar 2 a 3 gotas de reagente de Kovacs (tetrametil-p fenilenediamina dihidroclorato 1%) num pedaço de papel de filtro;
- 4- Tocar numa colónia de bactérias usando uma pipeta Pasteur e passar sobre o papel de filtro molhado;
- 5- As colónias com bactérias que contenham a atividade da enzima desenvolvem uma cor azul-roxo em mais ou menos 10 segundos, o que indica um teste positivo. A ausência de cor indica um teste negativo.

O teste à citocromo-oxidase (Teste da oxidase) é baseado na presença de uma enzima oxidase intracelular. As citocromo-oxidases são hemoproteínas que atuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo eletrões (e iões hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água. O teste utiliza um corante (tetrametil-p fenilenediamina dihidroclorato) que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio o que resulta no aparecimento de um produto (indofenol) de cor púrpura.

Na Tabela 4 é descrita a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase sobre radicais de oxigénio. A presença destas enzimas nas células é essencial para a sua viabilidade celular uma vez que detoxificam os radicais de  $\text{O}_2$  que se originam pelo metabolismo na presença de  $\text{O}_2$ .

Tabela 4. Reações químicas catalizadas por enzimas antioxidantes.

| Enzima               | Reação catalisada   |
|----------------------|---|
| Superóxido dismutase | $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$   |
| Catalase             | $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  |
| Peroxidase           | $\text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{NADH}_2} 2\text{H}_2\text{O} + \text{S}$  |

## MICROBIOLOGIA DA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO

### 1. APRESENTAÇÃO DO TEMA

As águas naturais, superficiais ou subterrâneas, podem conter vários tipos de microrganismos saprófitas, cujo habitat natural é o solo, a água ou o ar, sendo na sua maioria microrganismos inofensivos e cujo número e natureza variam consideravelmente de acordo com o lugar e as condições ambientais. No entanto, ao longo do seu percurso estas águas podem ser contaminadas com microrganismos patogénicos causadores de muitas doenças. Esta contaminação pode ser de esgotos domésticos contendo matéria fecal, de fossas sépticas, de águas pluviais urbanas, do escoamento de áreas agrícolas e do contacto com animais selvagens ou de animais com acesso a essas áreas.

A água para abastecimento público deve pois ser analisada periodicamente do ponto de vista microbiológico para se garantir a ausência de microrganismos patogénicos. O controlo da qualidade da água para consumo humano que é obrigatório pela legislação em vigor em Portugal (decreto-lei nº 306/2007), implica a pesquisa de microrganismos indicadores. Como indicação de poluição potencialmente perigosa recorre-se à deteção de microrganismos comensais de origem intestinal, quer humana quer animal, como é o caso de bactérias pertencentes aos grupos dos coliformes, dos enterococos fecais e do género *Clostridium*. Estas bactérias indicadoras não são por si próprias perigosas, mas revelam a existência de uma contaminação fecal da água e, consequentemente, a possibilidade de estarem presentes bactérias patogénicas.

Normalmente, a pesquisa direta de microrganismos patogénicos não é realizada por rotina por vários motivos: é dispendiosa; alguns microrganismos patogénicos estão presentes na água contaminada em pequeno número; permanecem viáveis por períodos curtos fora do organismo hospedeiro, e sofrem frequentemente transição para formas viáveis mas não cultiváveis, onde podem persistir por longos períodos de tempo (por exemplo endosporos de bactérias).

### 2. CRITÉRIOS E GRAUS DE EXIGÊNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA

Os critérios e graus de exigência na avaliação da qualidade da água e do seu risco para a saúde humana, dependem da sua utilização. Os critérios e os métodos analíticos de referência a utilizar na avaliação da qualidade das águas destinadas ao consumo humano estão estabelecidos, em Portugal, em Decretos-Lei publicados no Diário da República. Na tabela 5 são descritos alguns exemplos desta legislação.

Tabela 5. Parâmetros microbiológicos principais e valores paramétricos para avaliação da qualidade da água em função do tipo de utilização.



| Tipo de utilização da água   | Parâmetros microbiológicos principais e valores paramétricos - (UFC/volume de água analisada)   | Decreto-Lei ou Decreto-Regulamentar |
|--|---|-------------------------------------|
| Água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por um camião ou navios-cisterna, ou por fontanários não ligadas à rede de distribuição. | <i>Escherichia coli</i> - 0/100 ml de água analisada<br>Enterococos fecais- 0/100 ml<br><i>Clostridium perfringens</i> (esporos) - VMR: 0/100 ml  | 306/2007                            |
| Águas à venda em garrafas ou outros recipientes.   | <i>Escherichia coli</i> - 0/250 ml de água analisada<br>Enterococos fecais - 0/250 ml<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> - 0/250 ml<br>N.º total de bactérias heterotróficas a 22°C/ 100ml *<br>N.º total de bactérias heterotróficas a 37°C/ 20ml *  | 306/2007                            |
| Águas balneares (águas doces, correntes ou paradas, ou águas do mar).  | Coliformes totais - VMR: 500/100 ml; VMA: 10000/100 ml<br>Coliformes fecais - VMR: 100/100 ml; VMA: 2000/100 ml<br>Enterococos fecais - VMR: 100/100 ml<br>Salmonelas - VMR: 0/1 l  | 236/1998                            |
| Águas de piscinas e outros recintos com diversões aquáticas.   | Coliformes totais - VMR: 0/100 ml; valor limite: 10/100 ml<br><i>Escherichia coli</i> - valor limite: 0/100 ml<br>Enterococos fecais - valor limite: 0/100 ml<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> - valor limite: 0/100 ml<br>Total de <i>Staphylococcus</i> - VMR: 20/100 ml<br><i>Staphylococcus</i> produtor de coagulase - VMR: 0/100 ml | 5/1997                              |
| Águas destinadas à rega.   | Coliformes fecais - VMR: 100/100 ml   | 236/1998                            |

UFC - Unidade Formadora de Colónia; VMA - Valor Máximo Admissível; VMR - Valor Máximo Recomendado

\* Sem alteração anormal, com base no histórico de análises. Não é desejável que o número de colónias a 22°C e a 37°C seja superior a 100 e 20, respetivamente.

### 3. ÁGUAS SUPERFICIAIS E SUBTERRÂNEAS

A água que corre nos rios e riachos ou, que está contida nos lagos e lagoas constitui a água superficial, a água que se infiltra no solo até atingir o lençol freático constitui a água subterrânea.

Nas águas superficiais as fontes de microrganismos patogénicos incluem os esgotos e fossas sépticas, águas pluviais urbanas, escoamento de áreas agrícolas, de animais selvagens bem como de animais com acesso a essas áreas. As águas subterrâneas são menos vulneráveis à contaminação, uma vez que possuem uma barreira protetora de solo que impede a contaminação direta do lençol de água.

#### 3.1 Nascentes, Poços e Furos

As nascentes são o resultado da interceção do lençol de água com a superfície. A contaminação microbiológica destas águas não é usual exceto nos casos em que as nascentes são mais superficiais. O tratamento deste tipo de águas é relativamente simples quando comparadas com as águas superficiais pois, geralmente apresentam menor quantidade de matéria orgânica em suspensão (Private Water Supplies, 2006).

Os poços são captações pouco profundas e de grande diâmetro, cujo objetivo é a obtenção de água subterrânea. O diâmetro dos poços geralmente varia entre 1 e 5 metros e a sua profundidade normalmente não ultrapassa os 20 metros. Encontram-se geralmente em materiais não consolidados e a sua construção emprega métodos de escavação artesanais ou mecânicos. Normalmente não alcançam grandes profundidades, explorando apenas água de aquíferos livres.

Os furos são captações mais profundas e de menor diâmetro, realizados por especialistas recorrendo a brocas rotativas.

Os poços de menor profundidade são sujeitos a maior contaminação que os de maior profundidade ou os furos. No entanto, se construídos e localizados corretamente, ambos podem fornecer água de boa qualidade (Private Water Supplies, 2006).

### 3.2 Rios

A água dos rios está mais sujeita à poluição e a variações na sua qualidade ao longo de um ano. Por isso, estes problemas têm de ser considerados previamente à sua utilização, quer seja para consumo doméstico ou para fins recreativos.

A qualidade das águas superficiais pode variar bastante durante as diferentes estações do ano. A turvação e a contaminação microbiológica deste tipo de águas são maiores após períodos de chuva intensa. Devido a estes possíveis problemas, a captação de água para consumo doméstico a partir de águas superficiais só é considerada se não houver possibilidade de captação proveniente de águas subterrâneas.

## 4. CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS DE BACTÉRIAS

A análise bacteriológica da água deve inicialmente incidir na pesquisa das bactérias indicadoras de contaminação fecal e, se estas forem detetadas então segue-se uma segunda fase, no sentido de pesquisar a presença de bactérias patogénicas (como é o exemplo da *Salmonella*).

A concretização da segunda fase, de deteção e enumeração de bactérias patogénicas, só deve ser levada a cabo se a escola possuir equipamento que assegure a segurança biológica, como por exemplo uma Câmara de Fluxo Laminar.

### 4.1 Heterotróficos

Os microrganismos heterotróficos incluem bactérias, vírus e fungos. Estes microrganismos incluem membros da flora microbiana natural de ambientes aquáticos ou do solo mas podem também incluir membros provenientes de fontes de poluição. São microrganismos sensíveis a processos de desinfecção, as bactérias coliformes, microrganismos formadores de esporos e microrganismos que proliferam rapidamente em águas tratadas na ausência de desinfetantes residuais (WHO, 2003).

Na contagem total destas colónias são utilizados meios nutritivos sem inibidores ou agentes seletivos, com incubação a 22°C ou 37°C. Este parâmetro é útil no controlo e monitorização de tendências

e alterações súbitas da qualidade da água, pelo facto da informação obtida poder providenciar indicação de alterações sazonais e de longo prazo na qualidade bacteriológica da água (Water Quality and Public Health, 2002).

A quantidade de microrganismos detetados pode variar entre locais e amostras consecutivas, sendo que as causas principais do seu desenvolvimento são a temperatura, disponibilidade de nutrientes, incluindo carbono orgânico assimilável, falta de desinfetante residual e a estagnação das águas (WHO, 2008).

#### 4.2 Coliformes totais e termotolerantes

Este grupo é constituído por espécies bacterianas pertencentes, quase na totalidade, à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete, oxidase-negativas, não esporulantes, móveis e com metabolismo anaeróbio facultativo em meio de cultura seletivo contendo sais biliares. Têm a capacidade de fermentar a lactose. Os géneros principais que fazem parte do grupo dos coliformes são: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Edwardsiella*.

Algumas espécies de bactérias coliformes são saprófitas no solo podendo proliferar na superfície de plantas e passar para a água, sem ocorrência de contaminação fecal. Contudo, outras espécies como por exemplo a *Escherichia coli*, vivem exclusivamente no intestino de animais de sangue quente e estão incluídas no grupo dos coliformes fecais. Estes não permanecem viáveis na água ao fim de poucos dias após terem abandonado o intestino, pelo que a sua presença pode ser indício de contaminação fecal recente da água. A maior parte das bactérias coliformes fecais apresentam as propriedades dos coliformes e, além disso, são termotolerantes com capacidade para crescer e fermentar a lactose, quando incubadas a temperaturas mais elevadas (44°C).

Para avaliar a qualidade bacteriológica da água, cada amostra pode ser inicialmente sujeita à análise presuntiva da presença de bactérias coliformes totais, onde estão incluídos tanto os coliformes fecais como os coliformes ambientais, com base na sua capacidade para fermentar a lactose a 37°C. Sempre que sejam detetados coliformes totais, a água deve ser pesquisada relativamente à presença de coliformes termotolerantes, especificamente *E. coli*. Apesar de estudos recentes demonstrarem que, em situações pontuais, estas bactérias nem sempre se encontram associadas a poluição fecal (Cabral, 2010).

#### 4.3 Enterococos fecais

O género *Enterococcus* possui 17 espécies, podendo estas estarem associadas a plantas ou animais (Devriese *et al.*, 2006).

São bactérias em forma de cocos, podendo ocorrer isoladas, em pares ou em cadeias curtas. São Gram-positivas, catalase-negativas, não esporulantes, podendo ser aeróbias ou anaeróbias facultativas. Estas bactérias, ao contrário das *Enterobacteriaceae*, são capazes de crescer na presença de concentrações elevadas de sais biliares (40%) e concentrações de azida (0, 4%). Algumas espécies de *Enterococcus* são

tolerantes ao cloreto de sódio (6,5%) e a valores de pH alcalino. A maior parte das espécies tem uma temperatura ótima de crescimento nos 37°C mas, algumas crescem a 10°C e a 45°C (Devriese *et al.*, 2006).

Tipicamente os enterococos fecais são libertados através de fezes de humanos e animais homeotérmicos. *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são encontradas tanto em fezes de animais e humanos, sendo praticamente as duas únicas espécies que ocorrem em fezes humanas. Pelo contrário, nos animais também ocorrem *E. avium*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. hirae* (Cabral, 2010). Estas bactérias não se multiplicam no ambiente aquático mas, quando comparadas com *E. coli*, sobrevivem aí mais tempo sendo mais resistentes à desinfecção por cloro, servindo assim como indicadoras de poluição fecal (WHO, 2008). No entanto, a presença de enterococos em água nem sempre implica que tenha ocorrido contaminação fecal da água, uma vez que alguns podem ter tido origem noutros habitats, nomeadamente no solo (WHO, 2008).

*Enterococcus spp.* são maioritariamente inofensivos mas, em indivíduos hospitalizados durante longos períodos de tempo ou em indivíduos imunodeprimidos, podem manifestar a sua patogenecidade (Ogier *et al.*, 2007). Estas bactérias podem causar múltiplas infeções, tais como endocardites, infeções do sistema urinário, bacteremias, entre outras (Moreno *et al.*, 2006). Além disso, apresentam grande resistência a antibióticos, nos últimos anos têm sido alvo de particular atenção devido ao papel que têm no aumento das infeções em meio hospitalar. Este fenómeno deve-se por um lado à sua resistência intrínseca mas também à resistência adquirida pelo frequente uso de antibióticos (Devriese *et al.*, 2006).

*Enterococcus faecalis* é a espécie mais associada a infeções em humanos, enquanto que *E. faecium* é a espécie mais resistente a antibióticos, o que a torna mais virulenta (Devriese *et al.*, 2006).

*Enterococcus* desenvolvem facilmente resistência a antibióticos, tendo sido encontrados em ambiente hospitalar várias estirpes multirresistentes. Apesar de bactérias resistentes a antibióticos existirem na natureza anteriormente à utilização de antibióticos pelo homem, o uso destas substâncias pelo Homem na alimentação dos animais e na agricultura, favoreceu a seleção de estirpes resistentes.

A resistência a antibióticos usados como promotores de crescimento animal é particularmente preocupante pois podem interferir com os antibióticos usados no tratamento em humanos. O consumo de carne contaminada por bactérias com genes resistentes a antibióticos, vegetais que sejam regados com águas contaminadas ou a utilização de dejetos de animais para fertilizar campos de cultivo, constituem exemplos de situações em que pode ocorrer contaminação do Homem por bactérias resistentes aos antibióticos (Salyers, 2002; Dolliver e Gupta, 2008). O maior risco para o ser humano, no uso de antibióticos na agricultura e pecuária deve-se ao facto de esses antibióticos serem similares aos usados no tratamento de doenças em humanos, como resultado os mecanismos de resistência desenvolvidos podem-se facilmente estender a microrganismos que afetam também o Homem.

#### 4.4 *Escherichia coli*

São bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, não esporulantes, apresentam mobilidade e são anaeróbias facultativas (Welch, 2006).

O habitat natural destas bactérias é o intestino do homem ou de animais, onde geralmente não causam qualquer problema, no entanto, fora do seu habitat natural podem causar várias infeções sendo por isso consideradas como organismos indicadores de contaminação fecal, quando presentes em água ou alimentos.

Apesar de muitas estirpes de *E. coli* não serem patogénicas, algumas podem causar infeções intestinais e extraintestinais graves. As estirpes de *E. coli* patogénicas, que constituem a principal causa de infeções intestinais em humanos, encontram-se divididas em seis grupos de acordo com dados serológicos e com a sua virulência: enterotóxica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), aderente difusa (DAEC). Enquanto que as estirpes patogénicas associadas à meningite (MAEC) e ao sistema urinário (UPEC) são responsáveis, respetivamente, por septicemia neonatal/meningite e infeções urinárias (Welch, 2006). Segundo a WHO (1999) infeções causadas por ETEC constituem a causa mais frequente de diarreia tanto em humanos como em animais, estimando-se que sejam responsáveis por 600 milhões de casos de diarreia em humanos e pela morte de 800.000 humanos, principalmente crianças até aos 5 anos de idade. O contágio de *E. coli* pode ocorrer pessoa a pessoa, pelo contacto com animais, por alimentos ou água contaminada (WHO, 2008).

As estirpes EHEC são as que apresentam maior infectividade, bastando apenas 10-100 células para causar infeções, sendo os serótipos *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O11 responsáveis por diarreias não raras vezes fatais (Welch, 2006).

Como coliforme termotolerante é capaz de fermentar a lactose ou manitol, a temperaturas de 44°C. A capacidade de fermentar lactose constitui um teste clássico utilizado para distinguir *E. coli* dos géneros *Salmonella* e *Shigella*, uma vez que estes dois géneros são incapazes de fermentar a lactose. A maioria das estirpes de *E. coli* possuem a enzima  $\beta$ -glucuronidase e, por isso, hidrolisam o ácido 4-metilumbeliferil $\beta$ -D-glucorónico (MUG) em 4- metilmbeliferona, um produto fluorescente quando expostos à luz UV de elevado comprimento de onda (360 nm).

#### 4.5 *Samonella spp.*

*Salmonella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos com mobilidade, Gram-negativos, incapazes de fermentar a lactose e anaeróbicos facultativos.

Atualmente são reconhecidas duas espécies de *Salmonella*: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira dividida em 6 subespécies com bases em características bioquímicas. A quase totalidade das infeções humanas (99%) devem-se à *Salmonella enterica* subsp.I (Slauch. e Ellermeier, 2006).

O habitat natural de *Salmonella* é o intestino humano e de outros animais como aves e répteis. Estas bactérias são excretadas nas fezes de humanos e animais, podendo assim contaminar a água como resultado de descargas das fossas sépticas ou acidentes nas mesmas, ou águas provenientes da criação de animais que podem escorrer contaminando os cursos de água superficiais ou até mesmo infiltrarem-se indo contaminar água subterrânea. A transmissão ocorre via fecal-oral, seja através do contacto animal-animal, animal-homem ou homem-homem (WHO, 2007).

*Salmonella* à semelhança de outras bactérias patogénicas, tem-se vindo a tornar resistente a antibióticos (Parry, 2003).

## 5. MÉTODO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

Os principais métodos de isolamento de microrganismos indicadores presentes na água são o método de filtração por membrana, método do número mais provável e testes qualitativos de presença-ausência.

O método de filtração por membrana seguido de incubação em meio seletivo (dependendo do microrganismo) é o método eleito para este trabalho.

A técnica de filtração por membrana (Figura 22) consiste na filtração de um volume de amostra de água (geralmente 100 ml) através de uma membrana filtrante (geralmente com porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ ) que retém as bactérias. Por aplicação de vácuo a água passa pela membrana ficando as bactérias retidas na membrana, que é posteriormente transferida para os meios de cultura seletivos ou para meios de enriquecimento.

As colónias formadas são contadas 24 a 48 horas após a incubação (Tabela 6), fazendo-se uma estimativa da concentração de bactérias na amostra inicial de água, expressa em unidades formadoras de colónias (UFC) por volume de água filtrado.

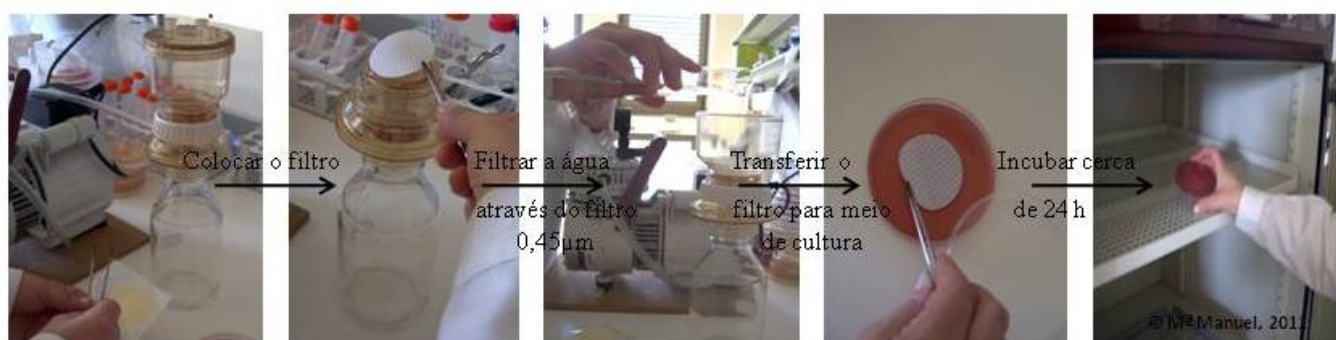


Figura 22. Técnica das membranas filtrantes na análise bacteriológica de águas.



Tabela 6. Temperaturas e tempos de detecção de bactérias indicadoras e outras, analisadas pelo método de filtração por membrana.

| Bactérias                  | Meio enriquecimento                    | Meio seletivo   | Temperatura /Tempo               |
|----------------------------|--|-----------------|----------------------------------|
| Colónias heterotróficos    | -                                      | Nutriente agar  | 37°C / 24 h                      |
| Coliformes totais          | -                                      | MacConkey       | 37°C / 24 h                      |
| Coliformes termotolerantes | -                                      | MacConkey       | 44°C / 48 h                      |
| <i>E. coli</i>             | -                                      | NA MUG          | 44°C / 24 h                      |
| <i>Enterococcus</i> spp.   | -                                      | Slanetz&Bartley | 44°C / 48 h                      |
| <i>Campylobacter</i> spp.  | Bolton Broth                           | Karmali         | 44°C/48 h<br>(em microaerofilia) |
| <i>Salmonella</i> spp.     | Água peptonada/<br>RappaportVassiladis | XLD             | 37°C / 24 h                      |

## 6. TESTE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A determinação da sensibilidade à terapêutica antibiótica é hoje fundamental, devido ao aumento cada vez maior de estirpes bacterianas resistentes a alguns antibióticos que, devido a isso, deixam de ser eficazes no tratamento de infeções.

Os antibióticos chegam ao ambiente aquático como resultado da atividade urbana ou agrícola. Os antibióticos que se encontram no ambiente aquático resultam da sua excreção durante os tratamentos para os quais são utilizados, pois não são totalmente metabolizados, ou do despejo direto nos esgotos a nível doméstico, hospitalar ou industrial (Kümmerer, 2009; Rooklidge, 2004). Uma vez presentes nas águas residuais, os antibióticos são descarregados diretamente para as águas superficiais ou são conduzidos para o sistema de tratamento de águas residuais. Esta presença de antibióticos nas redes hidrográficas pode originar uma pressão seletiva para favorecer o enriquecimento das águas para bactérias resistentes.

A tendência atual para um aumento da produção animal, sugere que a ocorrência de antibióticos em águas residuais agrícolas possa aumentar nos próximos anos (Lee *et al.*, 2007).

Muitas medidas têm sido propostas no sentido de reduzir a presença de antibióticos de origem urbana e da agricultura no ambiente aquático. A nível urbano, são exemplo as campanhas de sensibilização para a redução do consumo de antibióticos e a melhoria dos processos de tratamento de águas residuais bem como a implementação de técnicas de tratamento mais eficientes. Em relação aos antibióticos provenientes do sector produtivo primário, uma melhoria das práticas como o controlo da erosão dos solos, para reduzir as águas de escorrência, e o uso de filtros nas descargas provenientes de aquaculturas iria contribuir para a diminuição do seu impacto no ambiente (Davies *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1994).

Existem centenas de antibióticos, sendo a sua classificação feita de acordo com a estrutura química de base e o seu mecanismo de ação. Os antibióticos podem ser classificados como bactericidas, caso provoquem a morte da bactéria, ou como bacteriostáticos caso inibam o seu crescimento.

Os cinco principais modos de ação através dos quais os antibióticos exercem a sua ação (Figura 23) são: a inibição da síntese da parede celular; a inibição da síntese de proteínas; a inibição da síntese do ácido fólico; a interferência na síntese dos ácidos nucleicos e a alteração da permeabilidade da membrana celular.

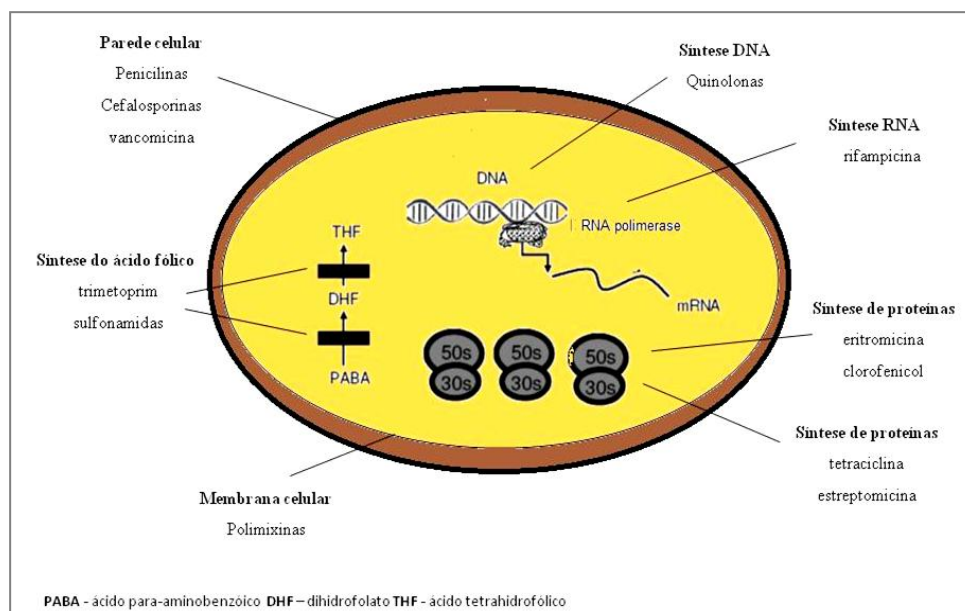


Figura 23. Mecanismos de ação dos principais grupos de antibióticos (adaptado de Madigan et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003).

Na escolha certa de um antibiótico, para combater uma doença/infeção, é fundamental a identificação do agente patogénico causador, bem como o conhecimento do modo de ação de cada grupo de antibióticos. Atualmente, e devido ao aumento de resistência microbiana ao uso de antibióticos, o conhecimento da suscetibilidade do microrganismo aos antibióticos também deve ser um fator a considerar.

A emergência da resistência antimicrobiana é uma ameaça para o ambiente e saúde pública. O uso de antibióticos só quando estritamente necessário e a prescrição adequada dos mesmos constituem medidas da maior importância para a impedir a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos (Levy, 2005).

Para avaliar *in vitro* a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos podem usar-se o Método de Diluição e o Método de Difusão. Neste trabalho utiliza-se o Método de Difusão, nomeadamente a técnica de Kirby-Bauer.

A técnica de Kirby-Bauer (Figura 24) consiste na sementeira de uma cultura bacteriana no meio de cultura Mueller-Hinton (sólido), após à qual se colocam discos de papel impregnados com diferentes antibióticos cujas concentrações são conhecidas. Após incubação a temperaturas e tempos adequados, medem-se os halos de inibição à volta dos discos de papel impregnados com os diferentes antibióticos. O tamanho dos halos, medidos em milímetros, é traduzido em suscetível (S) ou resistente (R).



Na interpretação dos diâmetros dos halos de inibição utilizam-se tabelas de referência, como por exemplo as do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Figura 24. Teste de sensibilidade a antibióticos segundo a técnica de Kirby-Bauer.



## 7. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

É importante que nesta fase os alunos se consciencializem que irão trabalhar com bactérias que poderão ser potencialmente patogénicas. As bactérias, uma vez que estão fora do seu habitat natural e vão ser cultivadas num meio de cultura promotor do seu crescimento, poderão constituir uma situação de perigo individual e coletivo. Assim, todas as regras de segurança, os cuidados de assepsia, a organização do trabalho laboratorial aprendidos na 1ª fase deste projeto devem ser relembradas.

### Material necessário para a realização da análise microbiológica da água

#### Equipamento

- Conjunto de filtração com uma fonte de vácuo (seringa ou bomba de vácuo)
- Estufa com temperatura regulável
- Banho de água com temperatura regulável
- Contador de colónias (opcional)
- Autoclave (ou panela de pressão)
- Placa de aquecimento

#### Material de laboratório

- |                               |                          |                   |             |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------|
| • Etanol a 70%                | • Papel higiénico        | • Marcador        | • Proveta   |
| • Discos de antibióticos      | • Frascos de cultura     | • Gobelé          | • Pinça     |
| • Água destilada              | • Pontas de micropipetas | • Caixas de Petri | • Vareta    |
| • Lamparina ou bico de Bunsen | • Filtros (0,45µm)       | • Micropipetas    | • Parafilme |

#### Meios de cultura

Meios de cultura necessários à identificação das bactérias. Estes devem já estar preparados e plaqueados em caixas de Petri.

### PROTOCOLO 9. Recolha de amostras para análise microbiológica

Os alunos devem ser divididos em grupos. Cada grupo de alunos tratará de realizar a análise microbiológica a um tipo de água (rio, poço, fontanário, torneira, etc).

Na recolha das amostras de água, esta deve ser colhida obedecendo aos cuidados de assepsia, deve ser representativa das características microbiológicas do material a analisar e deve ter volume suficiente

para permitir, se necessário, a repetição dos testes. É importante que a recolha da água seja efetuada no dia da análise. Nos dias de verão, é aconselhável o transporte das amostras numa mala térmica, para evitar alterações nas populações microbianas entre o momento da recolha e da análise da amostra.

Cada análise à água deve ser realizada duas vezes, preferencialmente em duas estações do ano distintas para se constatar, ou não, diferenças nas populações bacterianas.

#### **Procedimento de recolha de amostra de água de um rio ou reservatório**

- 1- Segurar o frasco numa zona perto da sua base e mergulhá-lo na água com a abertura virada para baixo. Deve mergulhar-se até cerca de 20 cm abaixo da superfície da água;
- 2- Virar o frasco até que o gargalo aponte ligeiramente para a superfície e a abertura esteja voltada contra a corrente. Se não existir qualquer corrente empurrar o frasco horizontalmente;
- 3- Recolher a amostra e fechar imediatamente o frasco;
- 4- Colocar um rótulo que contenha a identificação da amostra: nome do grupo; data de colheita e o local da amostragem.

#### **Procedimento de recolha de amostra de água de uma torneira**

- 1- Abrir a torneira, retirando qualquer filtro que possa estar presente e deixar correr a água em jato forte durante 1-2 minutos;
- 2- Fechar a torneira e limpá-la com um pouco de algodão embebido em etanol 70%. A seguir flamejar a torneira;
- 3- Abrir a torneira com cuidado e deixar a água correr de novo até arrefecer;
- 4- Abrir o frasco esterilizado e colher a água sem nunca tocar no interior da rolha ou no gargalo do frasco. Fechar imediatamente o frasco;
- 5- Colocar um rótulo que contenha a identificação da amostra: nome do grupo; data de colheita e o local da amostragem.

#### **PROTOCOLO 10. Detecção e enumeração de bactérias**

- 1- Identificar as caixas de Petri, já com os meios de cultura que se vão utilizar;
- 2- Medir um volume de 100 ml de água numa proveta;
- 3- Filtrar a água através do sistema de filtração (ao qual se colocou um filtro com a ajuda de uma pinça);
- 4- Retirar o filtro, com uma pinça, e transferi-lo para uma caixa de Petri contendo um meio de cultura;
- 5- Repetir, a partir do ponto 2, de acordo com o número de meios de cultura existentes;
- 6- Inverter e incubar nas condições de temperatura propostas para cada grupo de bactérias;
- 7- No final da incubação contar todas as colónias;
- 8- Calcular o número de UFC por volume de amostra.

Estas tarefas poderão ser realizadas de acordo com a proposta esquematizada na Figura 25.

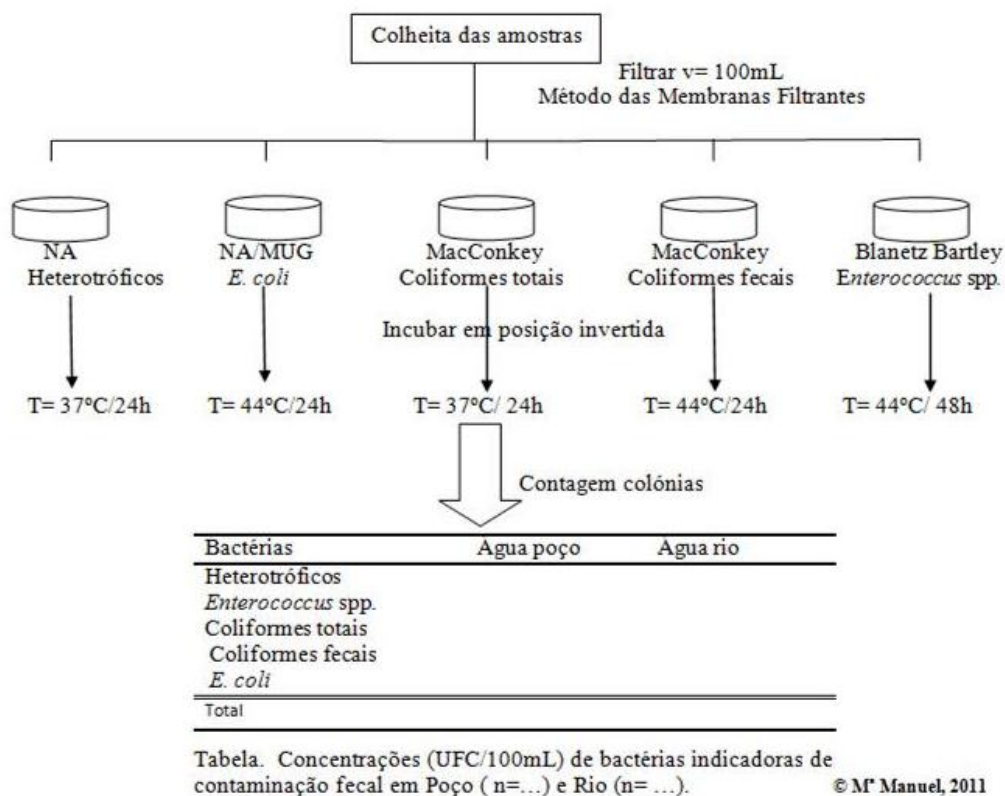


Figura 25. Fluxograma do trabalho a desenvolver.

#### PROTOCOLO 11. Isolamento de bactérias

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Realizar um riscado de colónias características obtidas na atividade anterior;
- 3- Inverter as placas e incubar à temperatura indicada para as bactérias identificadas;
- 4- Observar a existência de colónias isoladas.

#### PROTOCOLO 12. Teste sensibilidade a antibióticos

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri, contendo meio Mueller-Hinton, as seguintes indicações: organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Retirar uma ansada de uma colónia, isolada na atividade anterior, e suspender num tubo cónico volumétrico com 3 ml de meio Mueller-Hinton líquido. Agitar bem e colocar 2 a 3 horas numa estufa, com agitação, a 37°C (em alternativa agitar manualmente);
- 3- Após se verificar turvação da suspensão bacteriana, inocular 1 ml em placa contendo meio Mueller-Hinton sólido, verificando se toda a placa ficou em contacto com a suspensão. Retirar o excesso de inóculo com uma micropipeta;
- 4- Colocar os discos de antibióticos, no máximo 4 por placa, de acordo com as bactérias seleccionadas;
- 5- Inverter e incubar à temperatura de 37°C, durante 24 horas;
- 6- Medir os halos de inibição (em milímetros) em torno dos discos de antibiótico;
- 7- Comparar o tamanho dos halos de inibição com as tabelas de referência e concluir acerca da resistência/suscetibilidade dessas bactérias aos antibióticos testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cabral, J.P.S. (2010). *Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water*. International Journal Environmental Research and Public Health. **7**: 3657-3703.
- Demain, A.L. e Lancini, G. (2006). *Bacterial Pharmaceutical Product*. In *The Prokaryotes*. Volume 1, pp. 812-833. Editor M. Dworkin. Springer – Science + Business Media, New York.
- Davies, J.G., Truman, C.C., Kim, S.C. e Ascough, J.C. (2006). *Antibiotic transport via runoff and soil loss*. Journal of Environmental Quality. **35**: 2250-2260.
- Devriese, L., Baele, M. e Butaye, P. (2006). *Genus Enterococcus: Taxonomy*. In *The Prokaryotes*. Volume 4, pp. 163-174. Editor M. Dworkin. Springer – Science + Business Media, New York.
- Díaz, R. (1999). *Manual práctico de Microbiología*. 2ª Edição. Masson, S.A.
- Ferreira, A. (2004). *Projetos no ensino das Ciências*. Texto Editora.
- Dolliver, H.A. e Gupta, S.C. (2008). *Antibiotic losses from unprotected manure stockpiles*. Journal Environmental Quality **37**: 1238–1244.
- Ferreira, W. e Sousa, J. (1998). *Microbiologia*. 1º Volume. Lidel.
- Health Canada . (2006). *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document — Bacterial Waterborne Pathogens — Current and Emerging Organisms of Concern*. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario.
- Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge .(2004). *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia*.
- Lee, L.S., Carmosini, N., Sassman, S.A., Dion, H.M. e Sepúlveda, M.S. (2007). *Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality*. Adv Agron. **93**:1-68.
- Marques, E., Soares, R. e Almeida, C. (1999). *Técnicas Laboratoriais Biologia- Bloco1*. Porto Editora.
- Kummerer, K. (2009). *Antibiotics in the aquatic environment- a review- Part I*. Chemosphere. **75**: 417-434.
- Kunin, C.M. (1997). *Antibiotic armageddon*. Clinicl Infectious Diseases. **25**: 240-1.
- Levy, S.B. (2005). *Antibiotic resistance - the problem intensifies*. Advanced Drug Delivery Reviews, **57**: 1446-1450.
- Moreno, M.R., Sarantinopoulus, P., Tsakalidou, E. e Vuyst, L. (2006). *The role and application of enterococci in food and health*. International Journal of Food Microbiology. **106**: 1-24.
- Ogier, J.C. e Serror, P. (2007). *Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus*. International Journal of Food Microbiology. **126**: 291-301.
- Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J. e Farrar, J.J. (2002). *Typhoid fever*. New England Journal of Medicine. **347**: 1770-1782.

Parry, C.M . (2003). *Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica*. Current Opinion in Infectious Diseases **16**: 467-472.

Rooklidge, S.J. (2004). *Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways*. Science Total Environmental. **325**:1-13.

Salyers, A.A. (2002). *An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture*. Animal Biotechnology. **13**: 1-5.

Slauch, J.M. e Ellermeier, C. (2006). *The Genus Salmonella*. In The Prokaryotes. Volume 6, pp.123-158. Editor M. Dworkin. Springer - Science + Business Media, New York.

Smith, P., Donlon, J., Coyne, R. e Cazabon, D.J. (1994). *Fate of oxytetracycline in a freshwater fish farm: influence of effluent treatment systems*. Aquaculture. **120**: 319-325.

Swartz, M.N. (1997). *Use of antimicrobial agents and drug resistance*. New England Journal of Medicine. **337**: 491-2.

Water Quality and Public Health – Part 1. (2002). In The Microbiology of Drinking Water. pp. 9-35.

Welch, R. (2006). *The Genus Escherichia*. In The Prokaryotes. Volume 6, pp. 60-71. Editor M. Dworkin. Springer – Science + Business Media, New York.

Wise, R. (2002). *Antimicrobial resistance: priorities for action*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **49**: 585-586.

WHO. (2008). *Guidelines for Drinking Water Quality*. Third Edition incorporating the first and second addenda. 1º Volume. Geneva. WHO, IWA Publishing, London, UK.

WHO. (2003). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health*. WHO, IWA Publishing, London, UK.

WHO. (1997). Multidrug resistant *Salmonella typhimurium*. Fact Sheet Número 139. Disponível online <http://www.who.int/inf-fs/en/fact139.htm>

### **Protocolos de apoio utilizados:**

Abelho, M. (2011). Protocolos de Microbiologia Ambiental. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra.

Casal, M., Schuller, D., Rodrigues, G. e Pais, C. (2004). *Métodos convencionais em microbiologia*. Unidade I. Repositório Universidade do Minho.

Sinogas, C. (2010). *Biotecnologia. Material de apoio às práticas laboratoriais*. Universidade de Évora.

### **Sites utilizados :**

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) - <http://www.eucast.org>

European Centre for Disease Prevention and Control - <http://ecdc.europa.eu>

Instituto de Saúde Dr. Ricardo Jorge - <http://www.insa.pt>

National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS):  
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem>

Organização Mundial de Saúde (OMS):  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf> -  
Manual de biossegurança.

[www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_11.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_11.pdf) - Descrição bactérias presentes água.

[www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/zoonoses.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses.pdf) - Doenças zoonóticas relacionadas com água.

<http://www.oxoid.com> - Descrição dos meios de cultura

<http://www.dre.pt/pdf1sdip/2007/08/16400/0574705765.pdf> - Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto relativo à qualidade da água destinada ao consumo humano.

Microbiology Microbes everywhere

[http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayarticlesinchapter&chap\\_id=39](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayarticlesinchapter&chap_id=39)

### **Empresas de material:**

VWR International - Material de Laboratório Lda. : <http://www.vwr.com>.  
Catálogo Geral solicitar através do mail: [info@pt.vwr.com](mailto:info@pt.vwr.com)

Tel: 213600770 Fax: 213600798/99

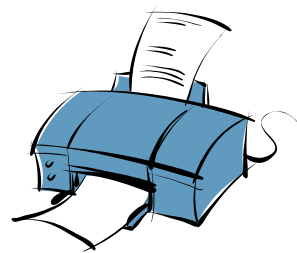
Quilaban, Lda. : [www.quilaban.pt](http://www.quilaban.pt) Tel: 219236350 Fax: 219236389

VidroLab2 Equipamentos e material de laboratório: [www.vidrolab.pt](http://www.vidrolab.pt) Mail: [vidrolab@vidrolab.pt](mailto:vidrolab@vidrolab.pt)

Tel: 224 119 999 Fax. 224 119 990



# PROTOCOLOS PARA OS ALUNOS



## INTRODUÇÃO

Para cultivar microrganismos em laboratório é necessário fornecer-lhes as condições mais adequadas para o seu crescimento. Existem diversos tipos de meios de cultura (Figuras 1 e 2), sólidos ou líquidos, que contêm diferentes quantidades e tipos de nutrientes que permitem a multiplicação de diferentes tipos de microrganismos em laboratório.

A técnica utilizada para preparar os meios é muito importante para obter um meio eficiente, devendo ser seguidas as indicações de cada fabricante na sua preparação.

## OBJETIVOS

- Preparar e plaquear meios de cultura.
- Identificar material de laboratório.
- Executar corretamente procedimentos experimentais.

## PROCEDIMENTO

- 1- Pesar a quantidade de meio necessário para preparar o volume que será indicado pela professora, seguindo as instruções da embalagem;
- 2- Medir o volume necessário de água destilada numa proveta e transferir para um frasco de cultura o meio pesado e a água destilada;
- 3- Agitar numa placa de aquecimento até obter uma solução límpida;
- 4- Tapar o frasco com a rolha de algodão e papel de alumínio;
- 5- Caso seja necessário, colocar o frasco com o meio de cultura a esterilizar na autoclave<sup>1</sup>;
- 6- Arrefecer até atingir uma temperatura que permita o seu manuseamento;
- 7- Verter o meio de cultura para as caixas de Petri em condições de assepsia, fazendo uma camada de aproximadamente 5 mm;
- 8- Deixar solidificar e depois identificar com o nome do meio de cultura e a data da sua elaboração;
- 9- Inverter as placas e guardar no frigorífico.

Figura 2. Meios de cultura em placas.



Figura 1. Meios de cultura preparados.

😊 Não te esqueças de registar todos os cálculos.

😊 Relembra os cuidados de segurança.



<sup>1</sup>Na ausência do autoclave pode utilizar-se uma panela de pressão na esterilização de meios de cultura, contidos em frascos. Os frascos devem conter até ao máximo de dois terços da sua capacidade. Devem ser rolhados com algodão cardado e proteger-se com papel de estanho ou de embrulho atado com cordel. No caso de terem rolha de enroscar, a rolha não deve ficar muito apertada, de modo a permitir o equilíbrio das pressões durante a esterilização.

### **Preparação de meio de não comercial**

- 1- Colocar um bocado de carne num litro de água destilada deixando-se ferver durante 5 minutos;
- 2- Filtrar e adicionar, cuidadosamente, 15 g de Agar;
- 3- Ferver mexendo sempre com a vareta de vidro até dissolver completamente o agar;
- 4- Distribuir o meio de cultura, ainda quente, pelas placas de Petri esterilizadas;
- 5- Manter as placas tapadas e deixar arrefecer até o meio de cultura solidificar;

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em qualquer local, no ar, na água, nos alimentos e nos objetos que manipulamos diariamente. Os microrganismos interagem com outros seres vivos, podendo ou não ser patogênicos. Fora do seu ambiente natural eles são muitas vezes responsáveis pelo aparecimento de infecções. Assim, o cultivo e manipulação de microrganismos num laboratório deve envolver técnicas de assepsia por parte do manipulador.

## OBJETIVOS

- Preparar suspensões de microrganismos.
- Trabalhar de uma forma asséptica.

## PROCEDIMENTO

Para se obter uma suspensão com microrganismos pode-se recorrer às infusões.

- 1- Preparar uma infusão de batatas ou outro qualquer vegetal com antecedência de 5 dias;
- 2- Com uma ansa, recolher uma pequena porção da película formada na superfície da infusão;
- 3- Espalhar a película no meio de cultura escolhido;
- 4- Colocar parafilme para isolar a caixa de Petri;
- 5- Incubar, em posição invertida, para evitar a evaporação, numa estufa a 35°C durante 1 a 2 dias.

Pode-se em alternativa preparar uma suspensão densa de leveduras de *S. cerevisiae*. Estas leveduras são muito utilizadas como modelo experimental em estudos de biologia porque não são patogênicas, cultivam-se facilmente em laboratório em condições pré-determinadas e passíveis de serem controladas pelo manipulador. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter o seu genoma totalmente sequenciado, em 1996, o que veio reforçar a sua utilização enquanto organismo modelo.

😊 Lembra os cuidados de assepsia.



Figura 3. Colónias de bactérias em meio de cultura MacConkey.

As leveduras pertencem ao grupo dos fungos, são organismos eucarióticos unicelulares que existem no solo, ar, plantas, frutos e alimentos. A espécie mais conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae*.

**Meio YEPD** (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) é o meio mais utilizado para o crescimento de fungos e em particular de leveduras.

Fornece um excesso de carbono e azoto, assim como de aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas e metabolitos essenciais para um ótimo crescimento celular.

### **Preparação meio YEPD**

#### **Composição do meio**

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Extrato de levedura | 5g/L                |
| Peptona             | 10g/L               |
| Glucose             | 20g/L               |
| Agar                | 20g/L (meio sólido) |

Medir o volume de água destilada necessário ao qual se adiciona o extrato de levedura, a peptona e a glucose. Adicionar o agar e agitar até homogenizar. Perfazer o volume desejado, adicionando água. Autoclavar.

Trabalha sempre perto de uma lamparina ou bico de Bunsen, para manteres condições de assepsia.



Figura 4. Técnica de assepsia durante repicagens.

## INTRODUÇÃO

O isolamento de um determinado microrganismo em cultura pura a partir de uma população mista envolve o recurso a técnicas de isolamento de colónias. Estas técnicas permitem obter colónias individualizadas e espacialmente separadas que, teoricamente, são originadas a partir de uma única célula, correspondendo, por isso, a uma cultura pura de um microrganismo particular.

Para obter culturas puras pode-se recorrer a um método de isolamento bastante rápido, o método das estrias ou de riscado em placa. Neste método uma pequena porção de inóculo, colhida com uma ansa, é sucessivamente riscada na superfície de um meio de cultura sólido. O objetivo do riscado é o esgotamento do inóculo para obter uma colónia derivada de uma única célula inicial.

## OBJETIVOS

- Realizar riscados.
- Manipular material de laboratório.
- Trabalhar de uma forma asséptica.

## PROCEDIMENTO

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e retirar uma ansada da cultura a isolar (Figura 5);
- 3- Espalhar uma porção de cultura, riscando a superfície da placa (Figura 6) evitando danificar a superfície do agar;
- 4- Incubar as placas em posição invertida à temperatura ambiente, durante 24/48 horas;
- 5- Observar as placas e registar a existência de colónias isoladas.

Se estiverem completamente dispersas, as colónias correspondem à multiplicação de uma bactéria inicial e designam-se de Unidade Formadoras de Colónias (UFC). Se os microrganismos estiverem agregados não há correspondência entre o número de colónias obtido e o número inicial de microrganismos.

Maria Manuel Azevedo Gomes

😊 Colónia é um aglomerado macroscópico de células individualizadas. As células que a constituem provêm de uma única célula viável inicial. Uma colónia corresponde, assim, a uma cultura pura de um microrganismo.



Figura 5. Esterilização de uma ansa.

😊 Lembra os cuidados de segurança.

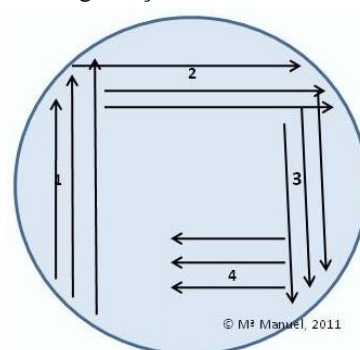


Figura 6. Riscado em placa.



Fotografa!



## INTRODUÇÃO

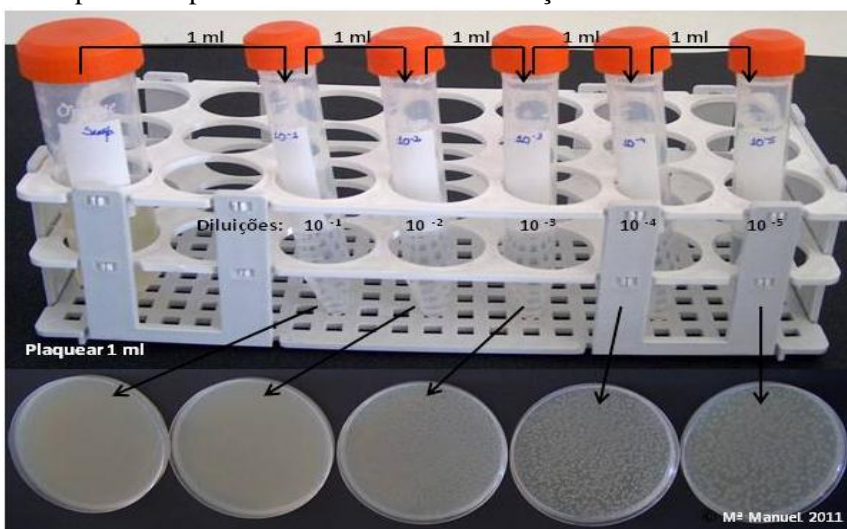
O Método das diluições sucessivas consiste na realização de diluições sucessivas da amostra, em condições de esterilidade, e posterior sementeira de quantidades conhecidas das mesmas em caixas de Petri. A sementeira consiste na distribuição uniforme do inóculo num meio de cultura. Tanto o método das diluições sucessivas, como o das estrias, pretendem o desenvolvimento de uma população a partir de uma única célula inicial.

## OBJETIVOS

- Realizar diluições.
- Manipular material de laboratório.
- Trabalhar de uma forma asséptica.
- Registar corretamente resultados.

## PROCEDIMENTO

- 1- Identificar os tubos de ensaio com  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;
- 2- Adicionar 9 ml de água esterilizada a cada tubo de cónico volumétrico;
- 3- Com uma pipeta estéril de 1 ml ou usando uma micropipeta com pontas estéreis, retirar 1 ml da suspensão já preparada;
- 4- Introduzir o volume de 1ml da suspensão no primeiro tubo de diluição ( $10^{-1}$ ) agitando por inversão a suspensão;
- 5- Com uma nova pipeta estéril retirar 1 ml da diluição  $10^{-1}$  e transferir para outro tubo para obter a diluição  $10^{-2}$ ;
- 6- Repetir este procedimento até obter a diluição  $10^{-6}$ .



Mantém um gobelé com lixívia diluída para colocares o material de plástico/vidro.

☺ Lembra os cuidados de assepsia.

☺ Realiza um registo cuidadoso.

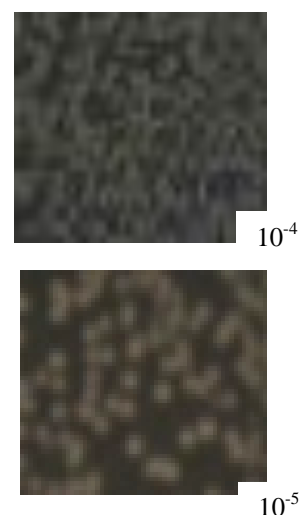


Figura 7. Método das diluições sucessivas e pormenor de diluições.

## Inoculação da cultura de leveduras por espalhamento no meio de cultura

- 7- Identificar as caixas de Petri na parte marginal da sua base com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, diluição, data do ensaio, identificação do grupo de trabalho;
- 8- Selecionar as três últimas diluições da suspensão  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  e agitar vigorosamente cada um dos tubos de ensaio;
- 9- Colocar 0,1 ml de cada uma das três diluições nas caixas de Petri contendo o meio de cultura;
- 10- Mergulhar o espalhador no copo contendo etanol absoluto e passar na chama do bico de Bunsen ou da lamparina. Deixar a chama apagar no espalhador e esperar cerca de 30 segundos até ele arrefecer (Figura 8);
- 11- Passar o espalhador sobre a superfície do meio de cultura, mantendo o espalhador numa posição vertical (Figura 9);
- 12- Incubar as caixas de Petri à temperatura ambiente, durante 24/48 horas;

*Para que os resultados sejam significativos as placas contáveis deverão ter entre 30 a 300 colónias. O número total de microrganismos obtém-se multiplicando o número de colónias pelo fator de diluição.*

- 13- Observar as caixas de Petri inoculadas anteriormente, selecionar apenas as que permitam contar entre 30 a 300 colónias e contar as colónias nas placas selecionadas;
- 14- Calcular o número de microrganismos em cada placa;
- 15- Calcular o número de células viáveis presentes na suspensão original (UFC/ml), i.e., a abundância de microrganismos cultiváveis.



Figura 8. Esterilização de espalhadores com álcool.



Figura 9. Espalhamento de uma suspensão.



Fotografa!

😊 Anota os resultados sob a forma de uma tabela.



**Lembra-te!** No final não te esqueças de limpar sempre a bancada de trabalho com etanol (70%). Separar corretamente o material para limpeza ou desinfeção.

## INTRODUÇÃO

Na descrição de microrganismos é importante ter em conta as características morfológicas do seu crescimento. A morfologia de uma colónia isolada na superfície de agar deve ser observada quanto ao seu tamanho, à cor, à forma, à elevação, à margem, ao aspeto da superfície, ao brilho, à opacidade e à sua consistência.

## OBJETIVOS

- Observar colónias de bactérias.
- Trabalhar de uma forma asséptica.
- Registar corretamente resultados.

## PROCEDIMENTO

1- Observar atentamente à lupa binocular as colónias das caixas de Petri, sem abrir as caixas;

2- Descrever as características morfológicas das colónias (Figura 10) em relação ao tamanho (medir o diâmetro da colónia com uma régua); à cor; à forma; à margem; à elevação; à superfície - textura (lisa/rugosa); ao brilho (brilhante/mate); à opacidade (transparente/opaca); à consistência (viscosa/granulosa).



Lembra-te!

Podem-se formar bactérias patogénicas



Relembra os cuidados de assepsia.



Anota os resultados sob a forma de uma tabela.



Fotografa!

| FORMA    | Punctiforme | Circular | Filamentosa | Irregular | Rizoide    | Lenticular |
|----------|-------------|----------|-------------|-----------|------------|------------|
|          |             |          |             |           |            |            |
| ELEVACÃO | Achatada    | Elevada  | Convexa     | Pulvinada | Umbiculada |            |
|          |             |          |             |           |            |            |
| MARGEM   | Inteira     | Ondulada | Filamentosa | Lobulada  | Serrada    | Enrugada   |
|          |             |          |             |           |            |            |

Figura 10. Características morfológicas das colónias de bactérias ([http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book\\_id=3&fig\\_number=4&chap\\_number=7](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=4&chap_number=7)).

## INTRODUÇÃO

Para a observação de microrganismos vivos pode recorrer-se a preparações a fresco. Este tipo de preparações permite, por exemplo, observar a existência ou não de mobilidade.

A observação de bactérias em preparações não coradas é difícil e por isso recorre-se a corantes. Estes permitem aumentar o contraste entre as células e o meio e observar estruturas particulares, como o invólucro celular, o material genético e outros constituintes citoplasmáticos. Na coloração simples aplica-se um único corante sobre o esfregaço durante um tempo específico. As células coram de um modo uniforme.

## OBJETIVOS

- Realizar técnicas de preparação e montagem de material para ser observado ao microscópio.
- Compreender a importância de diferentes técnicas de preparação de material para observação microscópica.

## PROCEDIMENTO

- 1- Colocar uma gota de água destilada esterilizada na lâmina;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e deixar arrefecer;
- 3- Retirar uma ansada proveniente de uma cultura de uma atividade anterior e suspender o material na gota de água;
- 4- Espalhar o líquido numa pequena área, esfregando bem de forma a separar a massa de células e depois colocar uma lamela;
- 5- Colocar um corante utilizando a técnica da irrigação;
- 6- Observar ao microscópio com a objetiva de imersão (100x)

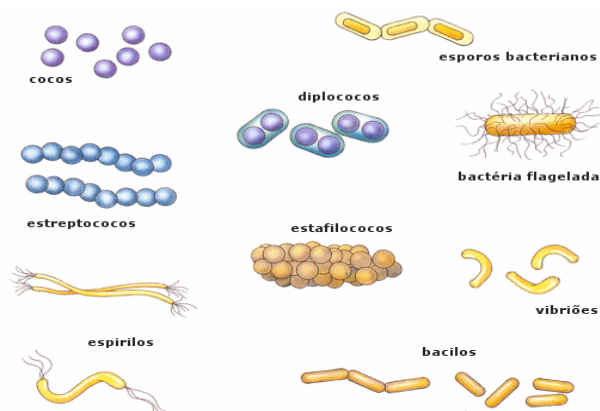


Figura 11. Formas que as bactérias podem apresentar (Técnicas Laboratoriais Biologia - Bloco1. Eva Marques *et al*, Porto Editora, 1999)

Maria Manuel Azevedo Gomes

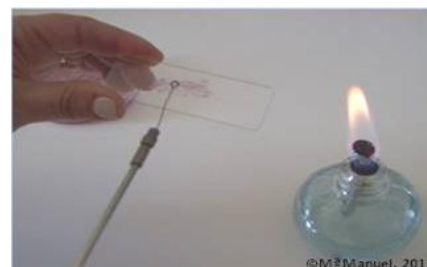


Figura 12. Técnica do esfregaço.



Figura 13. Técnica da irrigação.

☺ Relembra a constituição e funcionamento do microscópio.

$$A_{\text{Total}} = A_{\text{oc}} \times A_{\text{obj}}$$

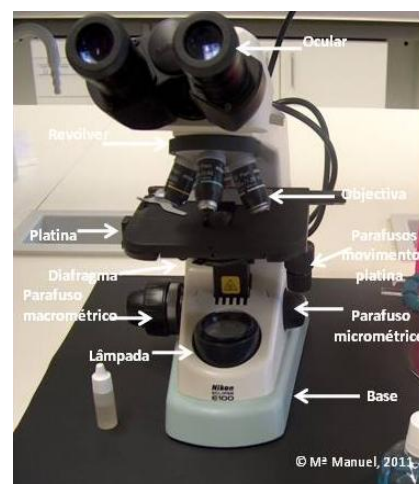


Figura 14. Constituição do microscópio óptico.

## INTRODUÇÃO

Na coloração diferencial aplica-se mais de que um corante e reagente. Uma das técnicas de coloração diferencial muito utilizada em bacteriologia é o método de Gram, este método permitem diferenciar organismos que reagem de modo diferente ao mesmo corante. As bactérias Gram-positivas, que retêm o corante violeta cristal e apresentam coloração violeta enquanto que as bactérias Gram-negativas, que não retêm o corante violeta cristal e são coradas pela safranina apresentando coloração vermelha. Ambas as células bacterianas são coradas com violeta cristal (cor azul-violeta) seguido pelo mordente (lugol) que forma com o corante violeta cristal um complexo intracelular. Este complexo é removido pelo etanol nas bactérias Gram-negativas mas permanece nas bactérias Gram-positivas. Nas bactérias Gram-negativas o peptidoglicano (constituente de todas as paredes celulares bacterianas) é menos espesso do que nas bactérias Gram-positivas, permitindo a passagem desse complexo e a sua posterior coloração vermelha quando utilizado o corante safranina.

## OBJETIVOS

- Realizar o método de coloração de Gram.
- Distinguir bactérias pelo método de Gram.
- Interpretar resultados de uma atividade experimental.

## PROCEDIMENTO

- 1- Colocar uma gota de água destilada esterilizada na lâmina;
- 2- Esterilizar uma ansa à chama e deixar arrefecer;
- 3- Tocar na colónia (protocolo anterior) com a ansa e suspender o material na gota de água;
- 4- Espalhar o líquido numa pequena área, esfregando bem de forma a separar a massa de células;
- 5- Segurar a lâmina com uma pinça e passar rapidamente sobre a chama até toda a água evaporar para fixar o material;
- 6- Numa tina (Figura 17), inundar o esfregaço fixado com violeta de cristal (corante primário) agitando suavemente durante cerca de 1 minuto;



Figura 15. *Escherichia coli*; bacilos, Gram–  
([http://pt.wikibooks.org/wiki/Biologia\\_celular/Bact%C3%A9rias](http://pt.wikibooks.org/wiki/Biologia_celular/Bact%C3%A9rias))

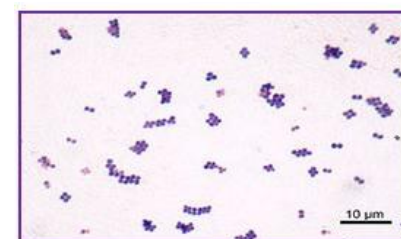


Figura 16. *Staphylococcus aureus*, cocos, Gram +.  
(<http://www.infoescola.com/microbiologia/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas>)



Fotografa as diferentes etapas da coloração de Gram.



Figura 17. Tina de coloração para executar a técnica de Gram.



7- Lavar com água corrente, começando na extremidade da lâmina e deixando escorrer com cuidado por cima do material fixado;

8- Inundar novamente o esfregaço agora com solução de Lugol, deixando atuar durante 1 minuto (vai-se formar um complexo insolúvel com o violeta cristal);

9- Lavar novamente com água corrente e secar agitando ou utilizando cuidadosamente papel de filtro;

10- Inundar o esfregaço com etanol 95 % (agente descolorante), agitando suavemente durante 1 minuto;

11- Inundar novamente com safranina, como corante contrastante (vermelho), durante 30 segundos, lavar e secar com papel de filtro;

12- Observar ao microscópio, esquematizando a melhor observação.

Nas bactérias Gram-negativas, o etanol remove os lípidos da membrana externa da parede celular (Figura 18), aumentando a sua permeabilidade; o complexo violeta cristal-iodo pode assim ser extraído, descolorando as bactérias que podem ser coradas com a safranina, de cor **vermelha**.

Nas bactérias Gram-positivas (Figura 18), o tratamento com etanol resulta na sua desidratação, com redução da permeabilidade da parede de peptidoglicano, mais espessa do que as Gram-negativas e consequente retenção do complexo violeta cristal-iodo, mantendo-se assim a cor do primeiro corante, coloração **azul/violeta**.

Pesquisa qual a função do lugol.

Regista a forma e a dimensão das bactérias.

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram -

😊 No final não te esqueças de limpar a objetiva de imersão, bem como a tua bancada de trabalho.

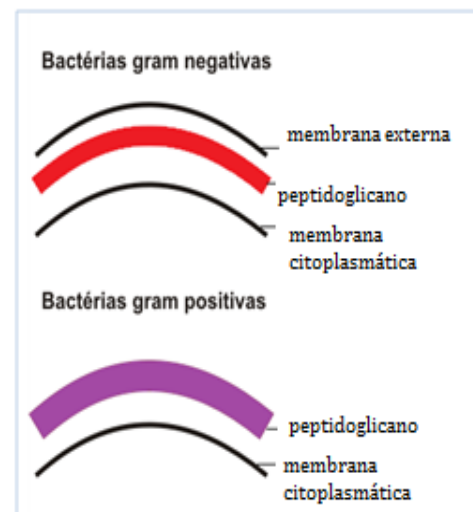


Figura 18. Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram - e Gram +.



## INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos possuem enzimas que os protegem dos efeitos dos produtos da redução do oxigénio, que são extremamente tóxicos destruindo rapidamente as células devido a serem agentes oxidantes. Os microrganismos aeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos contêm geralmente a enzima catalase que catalisa a destruição do peróxido de hidrogénio e a enzima citocromo-oxidase, que integra a cadeia transportadora de eletrões. Os anaeróbios obrigatórios não têm ambas as enzimas e por isso não toleram o oxigénio. O teste da atividade destas enzimas permite saber qual a relação de um microrganismo com o oxigénio.

## OBJETIVOS

- Determinar a existência de enzimas relacionadas com o metabolismo do oxigénio
- Concluir com base em resultados obtidos em atividades experimentais.

## PROCEDIMENTO

- 1- Com a ponta de uma pipeta de Pasteur ou com palito, transferir a colónia em estudo para a lâmina de vidro;
- 2-Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 10% e observar imediatamente se existe ou não formação de bolhas de ar. Se existir a reação é positiva.
- 3- Colocar 2 a 3 gotas de reagente de Kovacs (tetrametil-p fenilenediamina dihidroclorato 1%) num pedaço de papel de filtro;
- 4- Tocar numa colónia de bactérias usando uma pipeta Pasteur e passar sobre o papel de filtro molhado;
- 5- As colónias com bactérias que contenham a atividade da enzima desenvolvem uma cor azul-roxo em mais ou menos 10 segundos, o que indica um teste positivo. A ausência de cor indica um teste negativo.

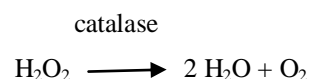
**Aeróbios obrigatórios:** necessitam de oxigénio para crescerem.

**Anaeróbios obrigatórios:** não precisam do oxigénio além de que este é tóxico, matando ou inibindo o seu crescimento.

**Anaeróbios facultativos:** podem permutar entre tipos de metabolismo aeróbios e anaeróbios.

**Anaeróbios aerotolerantes:** são indiferentes à presença de oxigénio

O teste à citocromo-oxidase é baseado na presença de uma enzima oxidase intracelular. As citocromo-oxidases atuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo eletrões (hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água. O teste utiliza um corante (tetrametil-p fenilenediamina dihidroclorato) que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio o que resulta no aparecimento de um produto (indofenol) de cor púrpura.



Atenção! Culturas com mais de 24h podem dar falsos negativos.

Regista a mudança de cor.

Regista se houve ou não libertação de bolhas de ar.

## INTRODUÇÃO

Na recolha das amostras de água, esta deve ser colhida obedecendo aos cuidados de assepsia, deve ser representativa das características microbiológicas do material a analisar e deve ter volume suficiente para permitir, se necessário, a repetição dos testes. É importante que a recolha da água seja efetuada no dia da análise. Nos dias de verão, é aconselhável o transporte das amostras numa mala térmica, para evitar alterações nas populações microbianas entre o momento da recolha e da análise da amostra.

## OBJETIVOS

- Realizar recolhas de amostras de água em condições de assepsia.

## PROCEDIMENTO

### Procedimento de recolha de amostra de água de um rio ou reservatório

- 1- Segurar o frasco numa zona perto da sua base e mergulhá-lo na água com a abertura virada para baixo. Deve mergulhar-se até cerca de 20 cm abaixo da superfície da água;
- 2- Virar o frasco até que o gargalo aponte ligeiramente para a superfície e a abertura esteja voltada contra a corrente. Se não existir qualquer corrente empurrar o frasco horizontalmente;
- 3- Recolher a amostra e fechar imediatamente o frasco;
- 4- Colocar um rótulo que contenha a identificação da amostra: nome do grupo; data de colheita e o local da amostragem.

### Procedimento de recolha de amostra de água de uma torneira

- 1- Abrir a torneira, retirando qualquer filtro que possa estar presente e deixar correr a água em jato forte durante 1-2 minutos;
- 2- Fechar a torneira e limpá-la com um pouco de algodão embebido em álcool. A seguir flamejar a torneira;
- 3- Abrir a torneira com cuidado e deixar a água correr de novo até arrefecer;
- 4- Abrir o frasco esterilizado e colher a água sem nunca tocar no interior da rolha ou no gargalo do frasco. Fechar imediatamente o frasco;
- 5- Colocar um rótulo que contenha a identificação da amostra: nome do grupo; data de colheita e o local da amostragem.

Os alunos devem ser divididos em grupos. Cada grupo de alunos tratará de realizar a análise microbiológica a um tipo de água (rio, poço, fontanário, torneira, etc).

Cada análise à água deve ser realizada duas vezes, preferencialmente em duas estações do ano distintas para se constatar, ou não, diferenças na composição bacteriológica.



Fotografa!

Regista o que achares importante do local de recolha, nomeadamente a presença de animais, o tempo, etc.

Procura fazer um enquadramento Geológico e Geográfico do local da recolha.

Faz uma pesquisa bibliográfica sobre o tipo de captações de água.

Procura informar-te sobre o tratamento a que é sujeita a água distribuída no local da recolha.

## INTRODUÇÃO

As águas naturais, superficiais ou subterrâneas, podem conter vários tipos de microrganismos saprófitas, cujo habitat natural é o solo, a água ou o ar, sendo na sua maioria microrganismos inofensivos e cujo número e natureza variam consideravelmente de acordo com o lugar e as condições ambientais. No entanto, ao longo do seu percurso estas águas podem ser contaminadas com microrganismos patogénicos causadores de muitas doenças. Assim, e como indicação de poluição potencialmente perigosa recorre-se à deteção de microrganismos comensais de origem intestinal, quer humana quer animal, como é o caso de bactérias pertencentes aos grupos dos coliformes e dos enterococos fecais. Estas bactérias indicadoras não são por si próprias perigosas, mas revelam a existência de uma contaminação fecal da água e, consequentemente, a possibilidade de estarem presentes bactérias patogénicas.

Os critérios e graus de exigência na avaliação da qualidade de uma água e do seu risco para a saúde humana dependem da sua utilização. Os critérios e os métodos analíticos de referência a utilizar na avaliação da qualidade das águas destinadas ao uso humano estão estabelecidos, em Portugal, em Decretos-Lei publicados no Diário da República. Na tabela seguinte apresentam-se alguns exemplos.

- Água destinada ao consumo humano (Decreto-Lei 306/2007)

|   |  |
|---|--|
| Redes de distribuição<br>camião ou navios-<br>cisterna, fontanários | <i>Escherichia coli</i> – 0 UFC/100 ml de água analisada<br>Enterococos fecais- 0 UFC/100 ml   |
| Águas à venda em<br>garrafas, outros<br>recipientes.                | <i>Escherichia coli</i> – 0UFC/250 ml de água analisada<br>Enterococos fecais – 0 UFC/250 ml<br>N.º total de bactérias heterotróficas a 22°C/100ml *<br>N.º total de bactérias heterotróficas a 37°C/ 20ml * |

- Águas para fins recreativos (Decreto-Lei 236/1998)

|   |  |
|---|--|
| Águas balneares<br>(águas doces,<br>águas do mar).                | Coliformes totais -VMR:500 UFC/100 ml; VMA: 10000/100 ml<br>Coliformes fecais - VMR: 100 UFC/100 ml; VMA: 2000/100 ml<br>Enterococos fecais - VMR: 100 UFC/100 ml<br>Salmonelas - VMR: 0 UFC/1 l                       |
| Águas de piscinas,<br>outros recintos com<br>diversões aquáticas. | Coliformes totais- VMR: 0 UFC/100 ml; valor limite: 10/100 ml<br><i>Escherichia coli</i> - valor limite: 0 UFC/100 ml<br>Enterococos fecais - valor limite: 0 UFC/100 ml<br><i>Staphylococcus</i> - VMR: 20 UFC/100 ml |

- Águas para rega (Decreto-Lei 236/1998)

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Águas destinadas à rega | Coliformes fecais - VMR: 100 UFC/100 ml |
|-------------------------|---|

Água superficial é a água que corre nos rios e riachos ou, que está contida nos lagos e lagoas.

Água subterrânea é a água que se infiltra no solo até atingir o lençol freático.

Faz uma pesquisa das características do grupo de bactérias coliformes, enterococos, heterotróficos e da *Escherichia coli*.

\* Sem alteração anormal, com base no histórico de análises. Não é desejável que o número de colónias a 22°C e a 37°C seja superior a 100 e 20, respetivamente.

UFC- Unidade Formadora de Colónia  
VMA- Valor Máximo Admissível  
VMR- Valor Máximo Recomendado

## OBJETIVOS

- Realizar análises bacteriológicas a águas.
- Concluir com base em resultados obtidos sobre a qualidade da água analisada.
- Inferir os perigos para a saúde individual e pública da contaminação bacteriológica da água.
- Apresentar medidas de proteção da contaminação da água.

## PROCEDIMENTO (Figura 20)

- 1- Identificar as caixas de Petri, já com os meios de cultura que se vão utilizar;
- 2- Medir um volume de 100ml de água numa proveta;
- 3- Filtrar a água através do sistema de filtração (ao qual se colocou um filtro com a ajuda de uma pinça);
- 4- Retirar o filtro, com uma pinça, e transferi-lo para uma caixa de Petri contendo um meio de cultura;
- 5- Repetir, a partir do ponto 2, de acordo com o número de meios de cultura existentes;
- 6- Inverter e incubar nas condições de temperatura propostas para cada grupo de bactérias;
- 7- No final da incubação contar todas as colónias;
- 8- Calcular o número de UFC por ml de amostra;
- 9- Comparar os resultados obtidos com a legislação e concluir.



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas.



Relembra os cuidados de assepsia.



Fotografa!

Regista os resultados na forma de tabela

**NA (nutriente agar):** meio de cultura não seletivo para microrganismos que não são muito exigentes em nutrientes.

**Agar Slanetz-Bartley:** meio seletivo para enterococos, que formam colónias avermelhadas. Este meio não deve ser autoclavado.

**Agar nutriente com MUG:** usado para detetar os organismos com base na fluorescência. Bactérias glucuronidasas positivas exibem fluorescência verde-azul visível sob uma luz ultravioleta.

**Agar MacConkey:** meio seletivo e diferencial. Contém lactose e um indicador de pH. As bactérias capazes de fermentar a lactose provocam uma diminuição no pH e apresentam cor violeta (coliformes), pelo contrário, as bactérias incapazes de fermentar a lactose apresentam cor branca/amarelada (não coliformes).

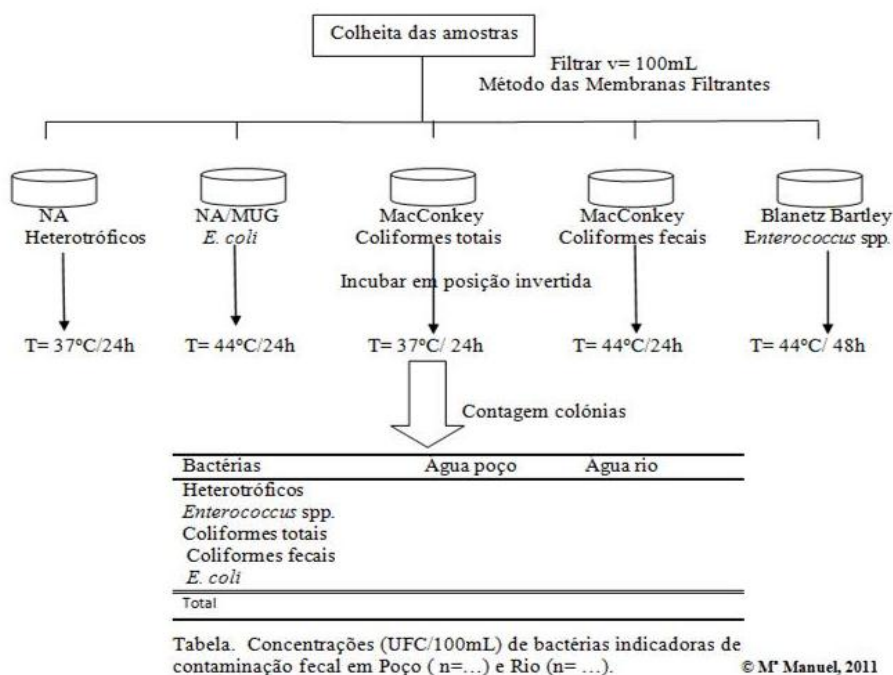


Figura 19. Esquema do trabalho a desenvolver.

## INTRODUÇÃO

Na atividade anterior observaram-se várias colónias de grupos diferentes de bactérias. É importante que se tenha a certeza que essas colónias observadas são puras. Para se ter a certeza que as colónias são culturas puras, recorre-se à realização do riscado em placa (Protocolo 3). Esta técnica vai permitir a obtenção de colónias individualizadas e espacialmente separadas que são originadas a partir de uma única célula, correspondendo a uma cultura pura de um microrganismo particular.

## OBJETIVOS

- Obtenção de colónias puras de bactérias.

## PROCEDIMENTO

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Realizar um riscado de colónias características obtidas na atividade anterior;
- 3- Inverter as placas e incubar à temperatura indicada para as bactérias identificadas, durante 24 horas;
- 4- Observar a existência de colónias isoladas.

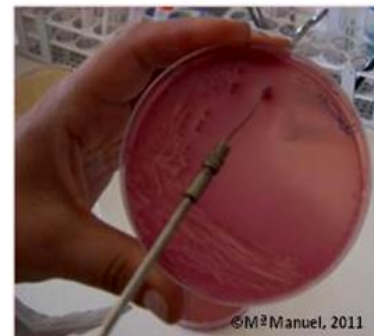


Figura 20. Seleção de colónias.



Lembra-te!

Podem estar presentes bactérias patogénicas



Relembra os cuidados de assepsia.



Fotografa!

## INTRODUÇÃO

A determinação da sensibilidade à terapêutica antibiótica é hoje fundamental, devido ao aumento cada vez maior de estirpes bacterianas resistentes a alguns antibióticos que, devido a isso, deixam de ser eficazes no tratamento de infeções.

A transferência de bactérias resistentes a antibióticos ao Homem pode ocorrer através da água ou da comida. O consumo de carne que contenha bactérias resistentes a antibióticos, vegetais que sejam regados com águas contaminadas ou a utilização de dejetos de animais para fertilizar campos de cultivo, constituem exemplos de situações em que pode ocorrer transferência de bactérias resistentes a antibióticos.

Para avaliar *in vitro* a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos pode-se usar a técnica de Kirby-Bauer.

A técnica de Kirby-Bauer (Figura 22) consiste na sementeira de uma cultura bacteriana no meio de cultura Mueller-Hinton (sólido), após à qual se colocam discos de papel impregnados com diferentes antibióticos cujas concentrações são conhecidas.

## OBJETIVOS

- Realização de testes de sensibilidade a antibióticos.
- Concluir sobre a resistência a antibióticos das bactérias estudadas.
- Prever consequências do aumento de bactérias resistentes a antibióticos.

## PROCEDIMENTO

- 1- Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri, contendo meio Mueller-Hinton, as seguintes indicações: organismo, data, identificação do grupo de trabalho;
- 2- Retirar uma ansada de uma colónia, isolada na atividade anterior, e suspender num tubo cónico volumétrico com 3 ml de meio Mueller-Hinton líquido. Agitar bem e colocar 2 a 3 horas numa estufa, com agitação, a 37°C (em alternativa agitar manualmente);
- 3- Após se verificar turvação da suspensão bacteriana, inocular 1 ml em placa contendo meio Mueller-Hinton sólido, verificando se toda a placa ficou em contacto com a suspensão. Retirar o excesso de inóculo com uma micropipeta;
- 4- Colocar os discos de antibióticos, no máximo 4 por placa, de acordo com as bactérias selecionadas;

Maria Manuel Azevedo Gomes

**Antibiótico:** termo inicialmente usado para substâncias de origem natural como as penicilinas (produzidas por fungos do género *Penicillium*) ou estreptomicina (produzidas por bactérias do género *Streptomyces*), cujo efeito era matar outros microrganismos. Atualmente, o termo antibiótico inclui substâncias produzidas por síntese química ou por modificação de um componente de origem natural e cujo efeito é matar ou atrasar o crescimento de microrganismos.

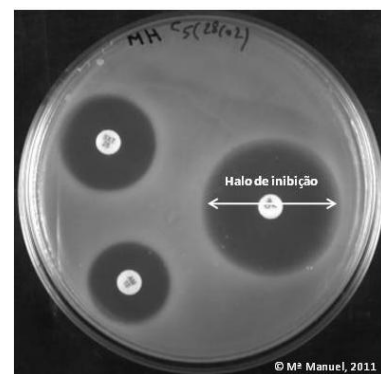


Figura 21. Técnica de Kirby-Bauer.



Fotografa!

Os discos de antibióticos usados dependem das bactérias a testar.

**Enterococos:** ampicilina, penicilina e vancomicina  
***E. coli*:** Penicilinas, Cefalosporinas, ciprofloxacina,  
***Salmonella*:** ampicilina, estreptomicina, tetraciclina, sulfametoxazol



- 5- Inverter e incubar à temperatura de 37°C, durante 24 horas;
- 6- Medir os halos de inibição (em milímetros) em torno dos discos de antibiótico;
- 7- Comparar o tamanho dos halos de inibição com as tabelas de referência e concluir acerca da resistência/suscetibilidade dessas bactérias aos antibióticos testados.

Tabelas de interpretação dos halos de inibição (Adaptado de: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Versão 1.3, janeiro, 2011)

Regista os resultados na forma de tabela.

Na interpretação dos diâmetros dos halos de inibição utilizaram-se tabelas de referência, como por exemplo, do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), disponíveis em: <http://www.eucast.org>.

### **Enterobacteriaceae**

|                            | Concentração (µg) | Diâmetro (mm) |     |
|----------------------------|-------------------|---------------|-----|
|                            |                   | S ≥           | R < |
| Ampicilina                 | 10                |               | 14  |
| Ciprofloxacina             | 5                 | 22            | 19  |
| Trimetropim-sulfametoxazol | 1.25-23.75        | 16            | 13  |

Faz uma pesquisa sobre as consequências do (ab)uso dos antibióticos.

### ***Enterococcus* spp.**

|                            | Concentração (µg) | Diâmetro (mm) |     |
|----------------------------|-------------------|---------------|-----|
|                            |                   | S ≥           | R < |
| Ampicilina                 | 2                 | 10            | 8   |
| Vancomicina                | 5                 | 12            | 12  |
| Linezolida                 | 10                | 19            | 19  |
| Trimetropim-sulfametoxazol | 1.25-23.75        | 50            | 21  |

**R** - resistente; **S** - sensível