

Diretora: Ercília Costa

#em#fOrm@ç@O#

Revista do Centro de Formação de Associação de Escolas de Amarante e Baião

Comissão Científica

Adriano Basto

Edgar Lamas

Antero Pereira

Hermínia Santos

Maria João Carvalho

Maria Odete Souto

Virgínia Oliveira

Neste Número:

3 Editorial**4** PROJETO NO ENSINO DA (MICRO)BIOLOGIA: UM GUIA DO PROFESSOR COM SUGESTÕES DE ATIVIDADES EM MICROBIOLOGIA - Maria Manuel Loureiro Azevedo Gomes**72** AÇÃO DE FORMAÇÃO (MICRO)BIOLOGIA PARA A SALA DE AULA: APLICAÇÕES PRÁTICAS EM LABORATÓRIO - REFLEXÕES

72 - PESQUISA DE BACTÉRIAS NA MUCOSA BUCAL - Maria João Marinho Costa Dias de Carvalho e Fernanda Maria da Silva Correia Jorge.

82 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE PLANTAS -M.A.P. Azevedo.

86 - APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE BACTÉRIAS : PESQUISA DE BACTÉRIAS NO AR - Cláudia Costa, Eugénia Pereira e Joaquim Mota

94 - PESQUISA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NA MÃO - Isabel Maria Pinto Ribeiro Carvalho, Maria de Lurdes Coelho Monteiro e Paula Cristina Silva Lima

Editorial

No momento em que estava a terminar este número da revista, dedicado ao ensino da microbiologia, é divulgado o relatório do PISA 2015 (Programme for International Student Assessment), uma semana após terem sido conhecidos os resultados do TIMMS (Trends in International Mathematics and Science Study) que nos deixou bastante satisfeitos com os resultados dos nossos alunos de 4.º ano, a matemática e a ciências.

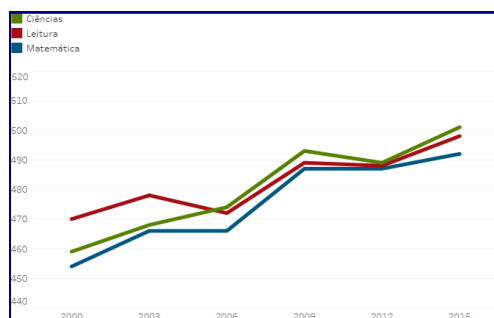
O PISA 2015 mostra que Portugal está no bom caminho e que o empenho de toda a comunidade educativa, na procura constante da melhoria e da excelência, tem colhido os seus frutos. Orgulhosamente olhamos para este estudo que, finalmente, nos colocam acima da média da OCDE, tanto nas ciências como na leitura.

O PISA é promovido pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico), desde 2000, e tem periodicidade trianual, sendo que, em cada ciclo, o teste PISA avalia três domínios, com ênfase num domínio principal (João Marôco *et al.*, 2016):



Fonte: João Marôco *et al.*, 2016: 1

O Instituto de Avaliação Educativa (IAVE) é o responsável pela aplicação dos testes em Portugal. Segundo João Marôco *et al.* (2016), de 2000 a 2015, verifica uma evolução do desempenho dos alunos portugueses de + 42 pontos (pts) a ciências, + 28 pts a leitura e + 38 pts a matemática.



Fonte: Jornal Expresso online (6/11/ 2016)

Não deixam, no entanto, de ser preocupantes os resultados das unidades da NUT III Tâmega e Sousa, que juntamente com o Alto Tâmega, evidenciaram diferenças mais acentuadas relativamente à média de Portugal.

Referências bibliográficas:

João Marôco (Coordenação) (2016). *PISA 2015 – PORTUGAL*. Volume I: Literacia Científica, Literacia de Leitura & Literacia Matemática. Lisboa: Instituto de Avaliação Educativa, I. P. Acedido em http://iave.pt/np4/file/310/Relatorio_PISA2015.pdf (06/11/2016 - 18h).

Jornal Expresso online Acedido em <http://expresso.sapo.pt/sociedade/2016-12-06-E-agora-no-PISA-alunos-portugueses-melhoram-a-ciencias-leitura-e-matematica> (06/11/2016 - 15h).

PROJETO

NO ENSINO DA (MICRO)BIOLOGIA

UM GUIA DO PROFESSOR COM SUGESTÕES DE ATIVIDADES EM MICROBIOLOGIA

Maria Manuel Loureiro Azevedo Gomes

PLANIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES

1. APRESENTAÇÃO

Na sequência da elaboração da dissertação de mestrado “*Bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas subterrâneas e superficiais do concelho de Baião*” foi realizado este trabalho que compila um conjunto de atividades experimentais, adaptadas ao contexto escolar, que visa 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.

1ªParte- 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;
- Realização de atividades laboratoriais;
- Outros que possam decorrer do trabalho a desenvolver.

2ªParte- 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 infecções intestinais. Deste modo, doenças relacionadas com água contaminada não só são a principal causa de morbidade 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.

Analisando 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 efetuadas 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.

I - 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 patogenicidade 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 laborató-

rios, 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 3. 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 protecção, 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 desinfecção podem ser utilizados métodos físicos (calor) e químicos (desinfetantes químicos).

- A desinfecção 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/desinfecção 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 desinfecção química incluem a resistência inata dos microrganismos, inativação devido à diluição ou contacto com outras substâncias (ex. matéria orgânica) e armazenamento inapropriado.

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 4).

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

Tabela 2. Valores comumente usados no autoclave.



Figura 4. 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.



Figura 5. Estufa

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

Tabela 3. Parâmetros comumente usados nas estufas.

- 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 6 e 7). 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 6. Esterilização de uma ansa de inoculação.



Figura 7. Flamejação 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 8), permitindo a retenção de 99,9% das partículas no ar que o atravessa.

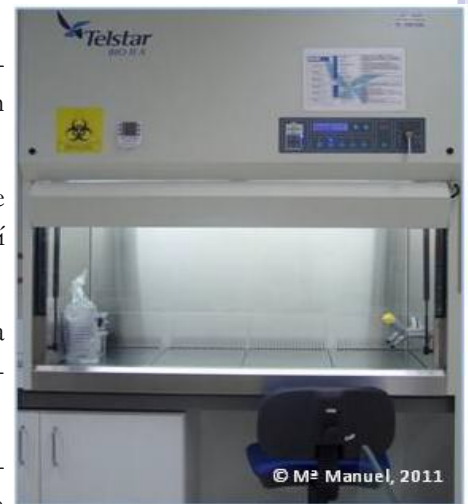


Figura 8. Câmara de fluxo laminar

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 9 é apresentado o material necessário para a preparação dos meios de cultura.



Figura 9. Materiais necessários para preparar 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

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, Salmonela & Shigela.

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 β -glucuronidase e, por isso, hidrolisam o ácido 4-metilumbeliferil β -D-glucorónico (MUG) em 4- metilmbeliferona, um produto fluorescente quando expostos à luz UV de elevado comprimento de onda (360 nm).

Na Figura 10 apresentam-se exemplos de meios de cultura já preparados.



Figura 10. 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 μm ou 0,2 μm , 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 11 apresentam-se os materiais utilizados no isolamento de microrganismos presentes em amostras de água através do método de filtração por membrana.



Figura 11. Materiais usados para filtrar amostras de água

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 μm)
- 7- Pinça
- 8- Caixa de Petri (com filtro)
- 9- Saco hermético
- 10- Caixa saquetas geradoras de CO_2
- 11- Saqueta geradora de CO_2

1.3.3 Material de microscopia

Os microrganismos possuem dimensões muito reduzidas, pelo que a sua visualização requer o uso de microscópio (Figura 12). O recurso à coloração e a técnicas de fixação do material biológico constituem duas etapas essenciais para a visualização de microrganismos



Figura 12. Exemplos de materiais usados em microscopia.

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

1.3.4 Material para realização do teste susceptibilidade 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 susceptibilidade 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 13 apresentam-se os materiais necessários para proceder à avaliação da susceptibilidade bacteriana a antibióticos através do Método de Difusão.



Figura 13. Material necessário para o teste de susceptibilidade a antibióticos, pelo 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

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 infetividade 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 desinfeção da bancada de trabalho são exemplos de medidas simples para impedir a contaminação.

A Figura 14 permite observar alguns exemplos de material básico utilizado na desinfeção e prevenção de contaminação



Figura 14. Materiais básicos para desinfeção

Legenda

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

1.3.6 Outro material de laboratório

Em qualquer laboratório podem-se encontrar um conjunto de materiais e aparelhos comuns (Figuras 15 a 18).

O **frigorífico** (Figura 15) é um aparelho fundamental num laboratório de microbiologia. As baixas temperaturas permitem a conservação de meios de cultura e outros reagentes, além disso permitem armazenar e manter culturas celulares em fases de não crescimento durante os períodos em que não são utilizadas.



Figura 15. Frigorífico



Figura 16. Banho termostático



Figura 17. Estufa com agitação

O **banho termostático** (Figura 16) 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 17) 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 18 apresentam-se alguns materiais de uso comum num laboratório.

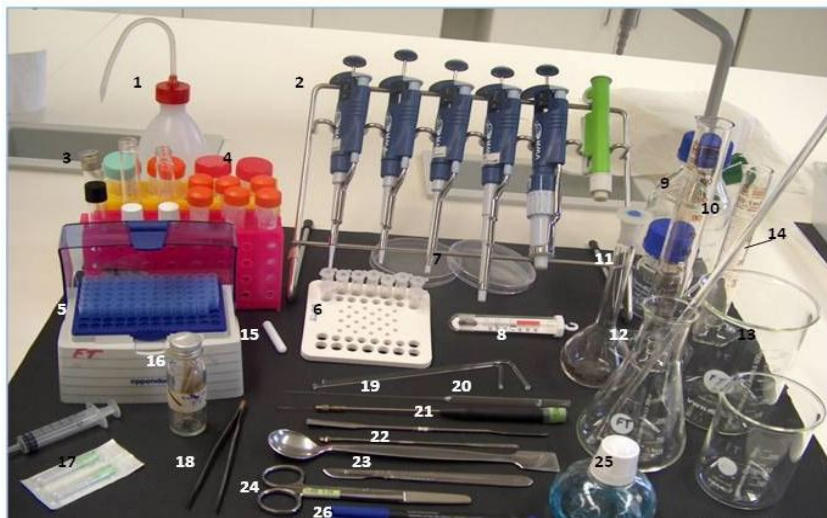


Figura 18. Alguns materiais comuns num laboratório

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 autoclave¹;
- 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.

¹ 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 19): 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.

2. Método das diluições sucessivas (Figura 20): 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.

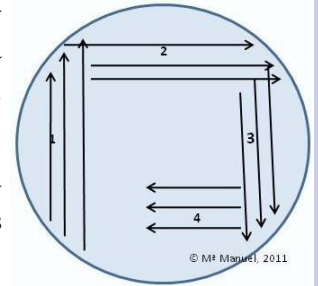


Figura 19. Riscado em placa

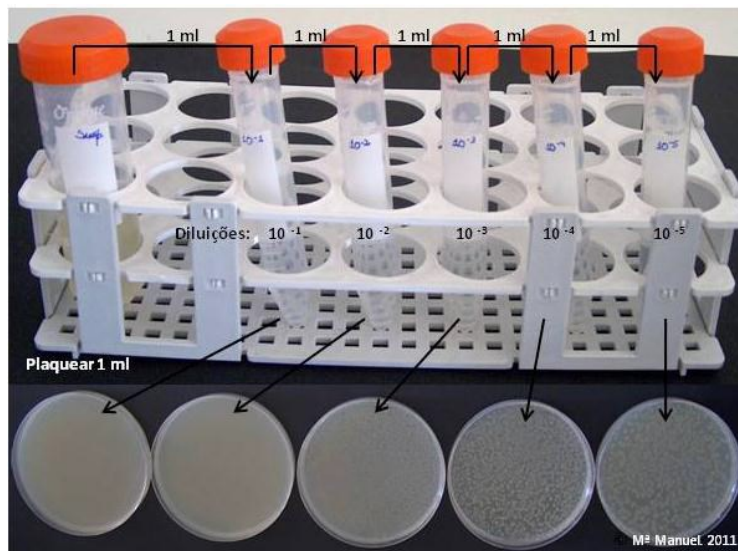


Figura 20. Método das diluições sucessivas

PROTÓCOLO 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.

PROTÓCOLO 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°C), congelação (-20°C, -70°C ou em azoto líquido: -180°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-preserveda 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 21 é apresentado algum material necessário à manutenção de culturas de microrganismos.

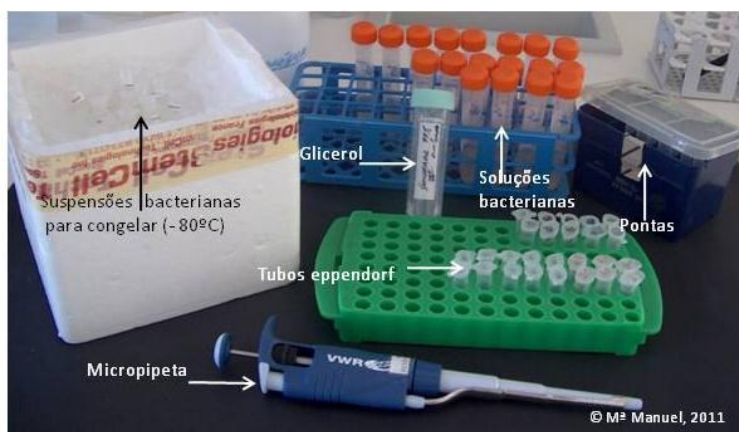


Figura 21. Material necessário para a manutenção de culturas microbianas

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 22).

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

Figura 22. 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_number7)

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, registando 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 23), 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, o tratamento com etanol resulta na sua desidratação, com redução da permeabilidade da parede de peptidoglicano, mais espessa do que as Gram-negativas e conseqüente retenção do complexo violeta de cristal-iodo,

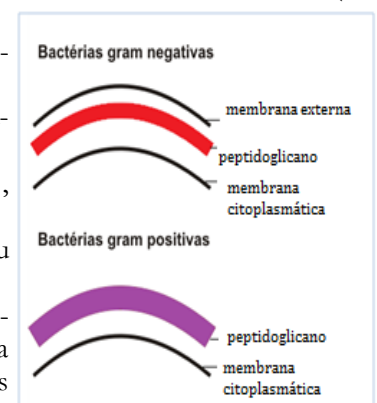


Figura 23. Representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

mantendo-se assim a cor do primeiro corante, coloração azul/violeta.

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_2) 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_2 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 (H_2O_2).

Certas bactérias anaeróbias aerotolerantes, como as bactérias produtoras de ácido láctico, embora não possuam a enzima catalase, decompõem o H_2O_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 (índofenol) 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 destoxificam os radicais de O_2 que se originam pelo metabolismo na presença de O_2 .

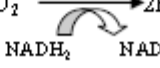
Enzima	Reacção catalisada
Superóxido dismutase	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalase	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
Peroxidase	$H_2S + H_2O_2 \xrightarrow{NADH_2} 2H_2O + S$ 

Tabela 4. Reações químicas catalisadas por enzimas antioxidantes.

2. APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE BACTÉRIAS

Os microrganismos podem colonizar praticamente qualquer habitat: solo, ar, pele, virtualmente qualquer superfície inerte ou viva.

Na interação com outros seres vivos, os microrganismos podem ser comensais, não induzindo qualquer dano no hospedeiro, simbióticos em que beneficiam ambos os intervenientes da relação, ou patogénicos quando causam infeções e doenças no hospedeiro.

2.1 Pesquisa de bactérias na mucosa bucal

A flora oral é constituída por bactérias, fungos e protozoários. Ela é responsável pela formação da placa dentária, um biofilme que se forma na superfície do dente e compreende diversos microrganismos, sobretudo bactérias, envolvidas numa matriz de polímeros de origem quer microbiana, quer do hospedeiro. Estes biofilmes encontram-se geralmente em equilíbrio dinâmico com o hospedeiro e são compatíveis com a manutenção da integridade dos tecidos colonizados. Mas, devido a alterações no ambiente oral, esta microflora causa cárie e doença periodontal.

Numa única cavidade oral humana podem ser encontradas 400 a 800 espécies distintas de microrganismos (Kazer et al., 2003). Apesar da maior parte ser considerada transitória, cerca de 20 espécies foram consideradas como fazendo parte da flora residente, incluindo bacilos e cocos Gram-positivos e Gram-negativos.

PROTOCOLO 9. Preparação de material para observação de bactérias da mucosa bucal

1ª Fase: Coloração de Gram

- 1- Colocar uma gota de água destilada numa lâmina esterilizada;
- 2- Com uma espátula estéril (ou palito) raspar a superfície da parte interna da boca e/ou das gengivas;
- 3- Espalhar a amostra na gota de água, fazendo um esfregaço;
- 4- Fixar pelo calor e executar a coloração de Gram (Protocolo 7);
- 5- Observar ao microscópio, esquematizando a melhor observação.

2ª Fase: Isolamento de bactérias

- 1- Identificar uma caixa de Petri que contenha um meio de cultura;
- 2- Esfregar a superfície da parte interna da boca e/ou das gengivas, com uma zaragatoa;
- 3- Colocar o inóculo numa parte da caixa de Petri com meio de cultura e executar a técnica do riscado

(Protocolo 3);

- 4- Inverter e incubar a 35°C durante um a dois dias;
- 5- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);
- 6- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células;
- 7- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:
 - Coloração de Gram (Protocolo 7);
 - Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

2.2 Pesquisa de bactérias no ar

A qualidade do ar refere-se ao grau de poluição do ar que respiramos. Na legislação o uso de parâmetros microbiológicos na avaliação da qualidade do ar ambiente não está contemplado, mas está prevista a monitorização da qualidade microbiológica do ar interior (Tabela 5).

A qualidade do ar no interior dos edifícios influencia a saúde dos seus utilizadores, além de ser um fator de conforto. A qualidade do ar interior deve, assim, ser avaliada periódica e sistematicamente, com o objetivo de garantir níveis mínimos de qualidade.

Os contaminantes biológicos incluem microrganismos (bactérias, fungos, vírus), ácaros, pólen, traças, pelo e fezes de animais. A quantidade e o tipo de contaminantes existentes dentro de um espaço fechado estão relacionados com a existência de suspensões orgânicas e minerais no ar; com a temperatura e a humidade relativa; com as condições de manutenção dos sistemas de climatização existentes e com a higiene das instalações bem como número dos seus ocupantes.

Existem dois métodos principais para a monitorização dos microrganismos do ar, a monitorização passiva e monitorização ativa.

A monitorização passiva realiza-se por sedimentação do ar em caixas de Petri, contendo meio de cultura não seletivo, abertas e expostas ao ar durante um determinado período de tempo. Este método apresenta a desvantagem de não permitir a contabilização direta do número de colónias por unidade de volume de ar. Além disso, as caixas de Petri podem ser contaminadas por microrganismos proveniente de outras fontes de contaminação que não o ar. No entanto, apresenta a vantagem de ser um método fácil de usar e com baixos custos.

Pelo contrário, a monitorização ativa permite a contabilização direta do número de colónias necessitando para isso de um amostrador de ar, que filtra volumes conhecidos através de um filtro que posteriormente é incubado em meio apropriado.

	Nº UFC/m ³
Bactérias	500
Fungos	500
<i>Legionella</i>	100

Tabela 5. Parâmetros microbiológicos e valores máximos admissíveis a considerar na determinação da qualidade do ar interior (Decreto-Lei 79/2006).

PROTOCOLO 10. Pesquisa de bactérias presentes no ar

1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes no ar de uma sala

- 1- Identificar uma caixa de Petri que contenha o meio de cultura NA;

2- Inocular o meio de cultura deixando as caixas de Petri abertas durante 30 minutos (cada grupo deve escolher dois locais para a amostragem);

3- Inverter e incubar as caixas de Petri a 30°C durante um a dois dias.

4- Registrar o número de UFC em cada caixa;

5- Calcular o número de UFC/ m³ do ar da sala;

6- Comparar o resultado obtido com a legislação e concluir.

2ª Fase: Observação e caracterização das bactérias presentes no ar

1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);

2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células;

3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:

- Coloração de Gram (Protocolo 7);
- Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

2.3 Pesquisa de bactérias em superfícies comuns

A amostragem e a análise das superfícies permitem determinar se os métodos de limpeza e desinfecção utilizados são eficazes.

Para a determinação de bactérias aeróbias mesófilas totais podem-se utilizar diferentes métodos: o das placas de contacto, o método de “lavagem”, e o método da zaragatoa.

Estes métodos não permitem um estudo da carga biológica porque apenas recolhem uma pequena proporção de microrganismos presentes. Contudo permitem avaliar a qualidade de higiene de superfícies planas como chão, mesas, alguns equipamentos e roupas.

O método da zaragatoa é o mais antigo e o mais utilizado para fazer o exame microbiológico de superfícies. Neste método utiliza-se uma zaragatoa humedecida em solução salina estéril para limpar uma superfície, plana ou não, com área conhecida e inocula-se num meio de cultura apropriado.

Embora não existam padrões estabelecidos, têm sido recomendados os seguintes critérios (Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge): Dispositivos médicos: 0 a 25 UFC é considerado bom; de 26 - 50 é considerado aceitável e mais de 50 UFC é considerado mau. Na roupa considera-se que a presença de menos de 5 UFC por placa constitui um resultado aceitável. Para mãos limpas o limite aceitável é até 5 UFC/dedo. Em superfícies os valores máximos admissíveis são de 100 UFC/m².

PROTOCOLO 11. Pesquisa de bactérias presentes em superfícies

1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes na superfície escolhida

1- Identificar uma caixa de Petri com o nome do meio de cultura e a data de elaboração;

2- Percorrer uma área de tamanho conhecido, utilizando uma zaragatoa estéril;

3- Fazer um riscado no meio de cultura com a zaragatoa;

4- Inverter e incubar as caixas de Petri a 30°C durante um a dois dias

5- Registrar o número de UFC em cada caixa;

6- Calcular o número de UFC por cm² da superfície estudada;

7- Comparar o resultado obtido com a legislação e tirar conclusões.

2ª Fase: Observação e caracterização das bactérias presentes na superfície escolhida

- 1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);
- 2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células.
- 3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:
 - Coloração de Gram (Protocolo 7);
 - Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

2.4 Pesquisa de bactérias em alimentos

Os alimentos e os microrganismos desenvolveram, desde sempre, uma interessante associação. Os microrganismos podem ser usados para transformar alimentos, como são exemplos o iogurte, os queijos, os pickles. O vinho, a cerveja e outras bebidas alcoólicas são, igualmente, resultado da atividade microbiana. No entanto, os alimentos também podem ser veículos de transmissão de doenças. As doenças de origem alimentar têm aumentado em todo o mundo, constituindo um dos mais importantes problemas de saúde pública a nível mundial. Dependendo dos microrganismos presentes nos alimentos, a sua multiplicação pode resultar na deterioração ou conservação dos mesmos.

As doenças alimentares dividem-se em dois grandes grupos: as infeções alimentares, causadas pela simples presença de um microrganismo patogénico no alimento e, as intoxicações, causadas pela ingestão de toxinas produzidas por certos microrganismos nos alimentos.

A salmonelose e a campylobacteriose são exemplos de infeções alimentares resultados da ingestão de diferentes espécies de Salmonella e Campylobacter, respetivamente. Exemplos de intoxicações alimentares são as causadas por Clostridium, exemplo do botulismo, e por Staphylococcus.

Durante o processo produtivo, os alimentos sofrem manipulação, transporte e contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos, embalagens, etc.) mais ou menos contaminadas com microrganismos o que pode levar à sua deterioração e ter consequências graves para a saúde pública.

A determinação dos microrganismos presentes num produto alimentar é o meio usado para avaliar a sua qualidade microbiológica (Tabela 6), podendo ser feito através do método clássico da enumeração em placas. Contudo este método é moroso devido aos períodos de tempo de incubação. Atualmente e, tendo em vista evitar surtos de doenças alimentares que podem afetar um elevado número de pessoas, utilizam-se técnicas mais rápidas e de maior especificidade e sensibilidade. Os métodos imunológicos (Enzyme Immuno Assay-EIA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) e os métodos de hibridação do DNA permitem a pesquisa específica de microrganismos ou dos seus metabolitos, como toxinas.

Grupo de alimentos	Qualidade microbiológica UFC/g (30°C)		
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório
1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$
3	$\leq 10^4$	$> 10^2 \leq 10^6$	$> 10^6$

Tabela 6. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

- Grupo 1: Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados.
- Grupo 2: Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas e com ingredientes crus.
- Grupo 3: Saladas/ Vegetais/Frutos crus.

PROTÓCOLO 12. Pesquisa de bactérias em alimentos

1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes no alimento selecionado

- 1- Pesar 10 gramas de amostra do alimento escolhido;
- 2- Adicionar 90 ml de água peptonada, 0,1% de peptona (p/v) ou solução salina (0,85% NaCl) de forma a obter uma diluição de 1/10;
- 3- Colocar a amostra num homogeneizador, de preferência um stomacher, ou alternativamente num gobelé, mexendo bem durante 4 a 5 minutos;
- 4- Deixar em repouso, durante cerca de 30 minutos;
- 5- Identificar tubos de ensaio e caixas de Petri com a data, o alimento e a diluição realizada;
- 6- Realizar as diluições necessárias em tubos com 9 ml de água peptonada e inocular os meios de cultura (Protocolo 4);
- 7- Inverter e incubar as placas durante 1 dia a 37°C;
- 8- Observar as placas e registar o número UFC por placa;
- 9- Calcular o número UFC multiplicando o número de colónias observado pelo fator de diluição correspondente a cada placa.

Nota: Para a contagem de microrganismos contabilizar como 1ª diluição a junção de 90 ml de água peptonada aos 10 g de amostra.

2ª Fase: Observação e caracterização das bactérias presentes no alimento selecionado

- 1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);
- 2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células.
- 3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:
 - Coloração de Gram (Protocolo 7);
 - Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

Produtos da fermentação láctica e alcoólica

Nem todos os microrganismos são patogénicos ou alteram os alimentos, alguns são utilizados pelo homem no fabrico de diferentes produtos. São exemplo disso as leveduras, utilizadas no fabrico do pão e das bebidas alcoólicas e as bactérias, utilizadas na produção de produtos lácteos.

Estes microrganismos realizam um processo de fermentação anaeróbio, ou seja, não utilizam oxigénio. Nessa via metabólica intervêm diferentes enzimas e obtêm-se produtos finais nutritivos, de elevado valor comercial, que o Homem aproveita para seu consumo. Contudo, a realização da fermentação pelos seres vivos tem como objetivo a produção de energia para o desempenho das suas atividades vitais.

A fermentação láctica do leite (Figura 24) ocorre por ação de bactérias como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que transformam os açúcares em ácido láctico. Esta transformação origina uma diminuição do pH e a coagulação do leite, formando-se assim o iogurte (Figura 25).

A cerveja é um produto que se obtém através da fermentação alcoólica (Figura 24), produzida por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 25). As leveduras transformam os produtos da hidrólise do amido, presentes nos cereais, em etanol e CO².

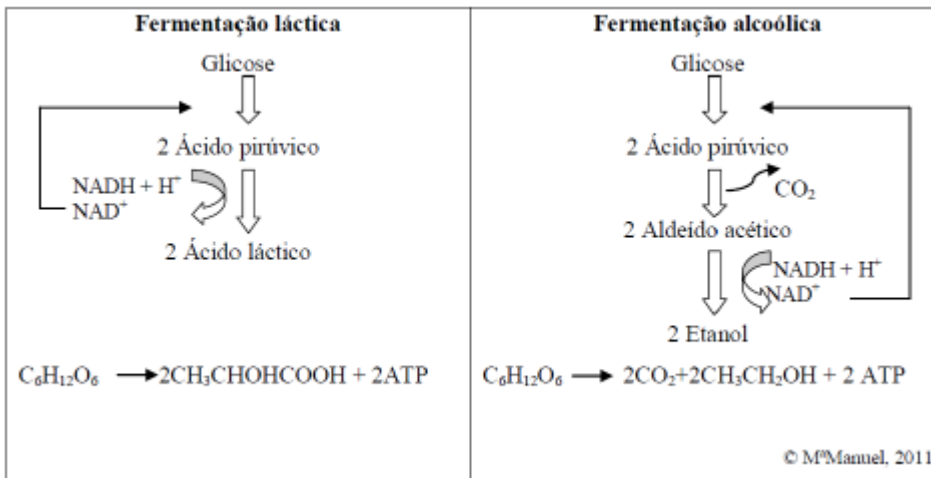


Figura 24. Representação da fermentação láctica e alcoólica.

PROTOCOLO 13. Produção de iogurte e cerveja

1ª Fase: Produção de iogurte

- 1- Colocar 5 ml de leite pasteurizado em 2 tubos de ensaio;
- 2- Adicionar uma ansada de iogurte natural a um dos tubos e misturar bem. Ao segundo tubo (controle) não se adiciona nada;
- 3- Incubar ambos os tubos durante cerca de 16 horas à temperatura de 46°C ou um dia à temperatura de 37°C.
- 4- Observar se o leite coagulou em ambos os tubos de ensaio;
- 5- Retirar uma amostra de ambos os tubos, fixar pelo calor e executar a coloração de Gram (Protocolo 7);
- 6- Observar ao microscópio, esquematizando a melhor observação.

2ª Fase: Produção de cerveja

- 1- Preparar uma solução de farinha de malte a 5%, agitando bem;
- 2- Encher 2 tubos de ensaio, contendo tubos Durhan, até cima e tapar, gerando assim um ambiente microaerofílico;
- 3- Incubar os tubos a 75°C durante 1 hora, para que ocorra a hidrólise do amido;
- 4- Esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos para eliminar os possíveis microrganismos presentes;
- 5- Deixar arrefecer os tubos e inocular um dos tubos com *Saccharomyces cerevisiae*;
- 5- Incubar os 2 tubos à temperatura ambiente durante vários dias;
- 6- Observar os tubos Durhan para verificar se ocorreu a libertação de gás (CO₂);
- 7- No tubo de ensaio em que se observa a libertação de CO₂ realizar uma coloração simples e observar ao microscópio.

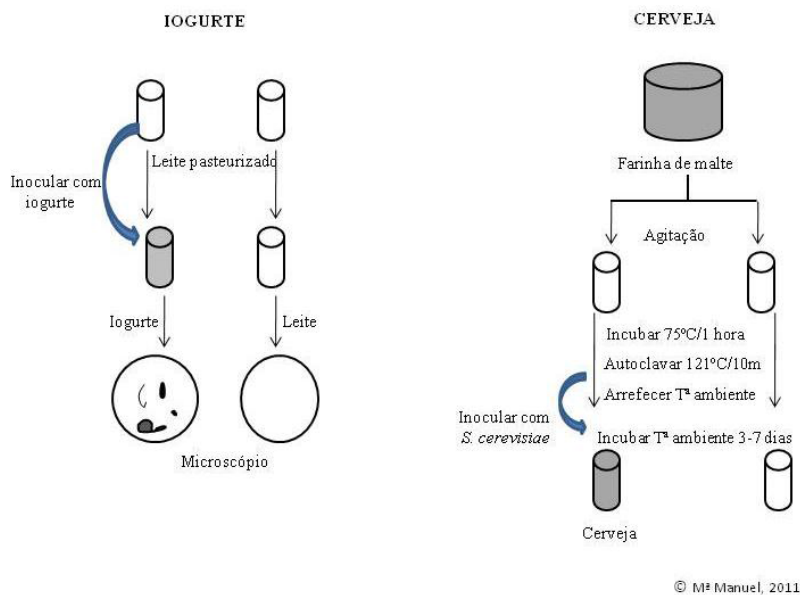


Figura 25. Representação geral do processo de formação de iogurte e cerveja.

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, conseqüentemente, 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.

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 Enterococos fecais- 0/100 ml <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 Enterococos fecais - 0/250 ml <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - 0/250 ml N.º total de bactérias heterotróficas a 22°C/ 100ml * 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 Coliformes fecais - VMR: 100/100 ml; VMA: 2000/100 ml Enterococos fecais - VMR: 100/100 ml	236/1998
Águas de piscinas e outros recintos com diversões aquáticas.	Coliformes totais - VMR: 0/100 ml; valor limite: 10/100 ml <i>Escherichia coli</i> - valor limite: 0/100 ml Enterococos fecais - valor limite: 0/100 ml <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - valor limite: 0/100 ml Total de <i>Staphylococcus</i> - VMR: 20/100 ml <i>Staphylococcus</i> produtor de coagulase - VMR: 0/100 ml	5/1997
Águas destinadas à rega.	Coliformes fecais - VMR: 100/100 ml	236/1998

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

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 valo-

res 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 desinfeção 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 noutras 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 patogenicidade (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 de doenças em humanos, como resultado os mecanismos de resistência desenvolvidos podem-se facilmente estender a microrganismos que afetam também o Homem.

O uso do avoparcin, como promotor de crescimento e o uso frequente de vancomicina nos hospitais, são apontados como responsáveis pelo elevado número de casos verificados de resistência a antibióticos.

Ampicilina, penicilina e vancomicina são os antibióticos usados no tratamento de infeções causadas por enterococos, no entanto, estes antibióticos mostram-se ineficazes quando estirpes resistentes estão envolvidas (Devriese et al., 2006).

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 infetividade, 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 β-glucuronidase e, por isso, hidrolisam o ácido 4-metilumbeliferilβ-D-glucorónico (MUG) em 4-metilumbeliferona, um produto fluorescente quando expostos à luz UV de elevado comprimento de onda (360 nm).

No tratamento recorrendo a antibióticos deve-se ter em atenção a conhecida resistência destas bactérias. Penicilinas, cefalosporinas, quinolonas constituem agentes eficazes no tratamento de infeções causadas por *E. coli*.

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), sendo comum a resistência à ampicilina, ao cloranfenicol, à estreptomina, ao sulfametoxazol e à tetraciclina. Os antibióticos do grupo das Fluoroquinolonas têm-se mostrado mais eficazes (Parry *et al.*, 2002), no entanto a resistência a estes antibióticos já se encontra documentada (Threlfall, 2002).

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 26) consiste na filtração de um volume de amostra de água (geralmente 100 ml) através de uma membrana filtrante (geralmente com porosidade 0,45 µm) 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 (CFU) por volume de água filtrado.



Figura 26. Técnica das membranas filtrantes na análise bacteriológica de águas.

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

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

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.

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 27) 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.

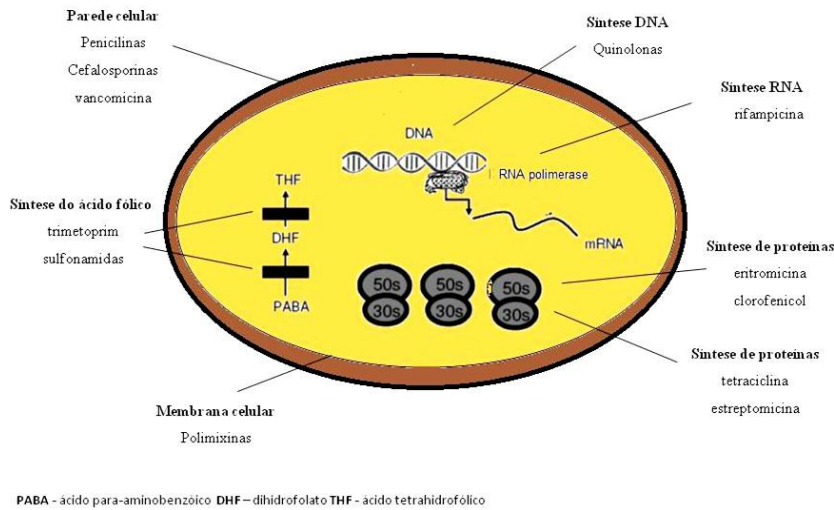


Figura 27. Mecanismos de ação dos principais grupos de antibióticos (adaptado de Madigan et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003).

As principais famílias de antibióticos usadas em terapia humana são: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas); Aminoglicosídeos (estreptomicina); Tetraciclina; Macrólidos (eritromicina); Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina) e Rifamicinas (Demain e Lancini, 2006).

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 microorganismo 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 28) 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).

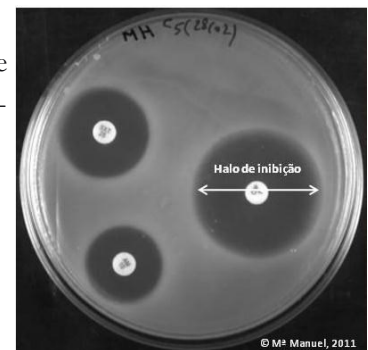


Figura 28. Teste de sensibilidade a antibióticos segundo a técnica de Kirby-Bauer.

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 lembradas.

Material necessário para a realização da análise microbiológica da água

Equipamento

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

Material de laboratório

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

Meios de cultura

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

PROTOCOLO 14. 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 mergu-

lhar-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 15. 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.

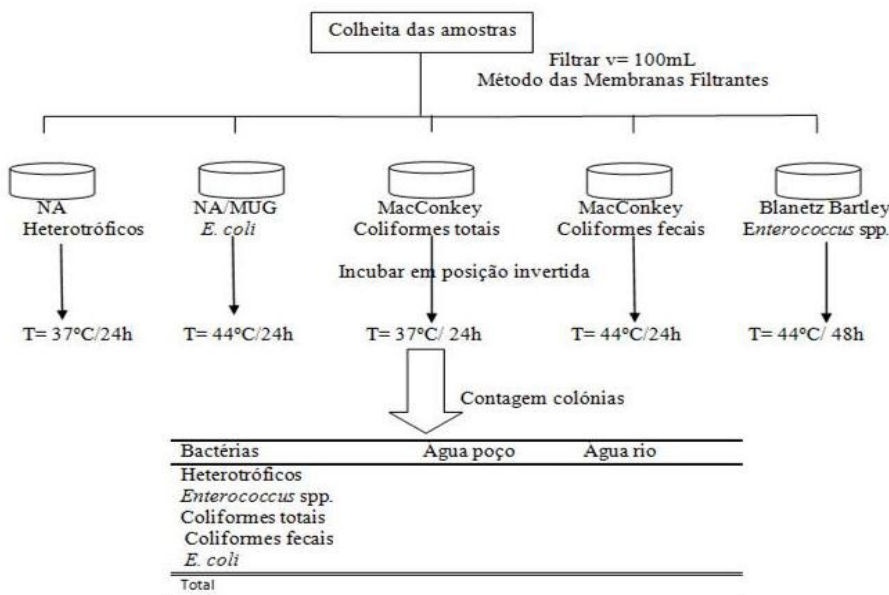


Figura 29. Fluxograma do trabalho a desenvolver.

Tabela. Concentrações (UFC/100mL) de bactérias indicadoras de contaminação fecal em Poço (n=...) e Rio (n= ...). © Mª Manuel, 2011

PROTOCOLO 16. 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 17. 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 selecionadas;
- 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.
- 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). *Projectos 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*.
- Marques, E., Soares, R. e Almeida, C. (1999). *Técnicas Laboratoriais Biologia- Bloco1*. Porto Editora.
- Kazor, C.E., Mitchell, P.M. e Lee, A.M. (2003). *Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients*. Journal Clinical Microbiology. **4**:558-63.
- 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.
- Morais, G.R., Silva, M.A., Carvalho, M.V., Santos, J.G.S., von Dolinger, E.J.O. e Brito, D.D. (2010). *Qualidade do ar interno em uma instituição de ensino superior brasileira*. Bioscience Journal. **26**: 305-310.
- 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.
- 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.
- 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). Multi-drug 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). *Biotechnology. 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 - Descrição bactérias presentes água.

www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses.pdf - Doenças zoonóticas relacionadas com água.

<http://www.oxid.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

Empresas de material:

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

Tel: 213600770 Fax: 213600798/99

Quilaban, Lda. : www.quilaban.pt Tel: 219236350 Fax: 219236389

VidroLab2 Equipamentos e material de laboratório: www.vidrolab.pt Mail: vidrolab@vidrolab.pt

Tel: 224 119 999 Fax. 224 119 990

PROTOSCOLOS 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 autoclave¹;
- 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 1. Meios de cultura preparados.

☺ Não te esqueças de registar todos os cálculos.

☺ Relembra os cuidados de segurança.



Figura 2. Meios de cultura em placas.

¹Na 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.

PROTOCOLO 2**Cultivo de microrganismos****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 patogénicos. Fora do seu ambiente natural eles são muitas vezes responsáveis pelo aparecimento de infeções. 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 patogénicas, 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.

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,

☺ Lembra os cuidados de assepsia.



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

precursores de nucleótidos, vitaminas e metabolitos essenciais para um ótimo crescimento celular.

Preparação meio YEPD

Composição do meio

Extracto de levedura	5g/L
Peptona	10g/L
Glucose	20g/L
Agar 2	0g/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 homogeneizar. Perfazer o volume desejado, adicionando água. Autoclavar.

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*.

Trabalha sempre perto de uma lamparina ou bico de Busen, para maneres condições de assepsia.



Figura 4. Técnica de assepsia durante repica-

PROTOCOLO 3**Isolamento por riscado em placa****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.

☺ 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.

☺ Relembra os cuidados de segurança.

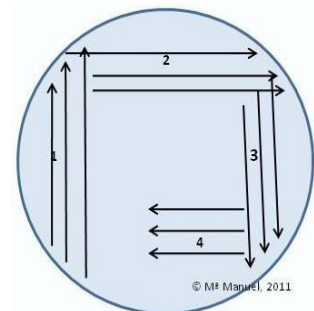


Figura 6. Riscado em placa.



Fotografa!

PROTOCOLO 4**Isolamento por diluições sucessivas****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.
- Registrar 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 colocalizar o material de plástico/vidro.

☺ Lembra os cuidados de assepsia.

☺ Realiza um registo cuidadoso

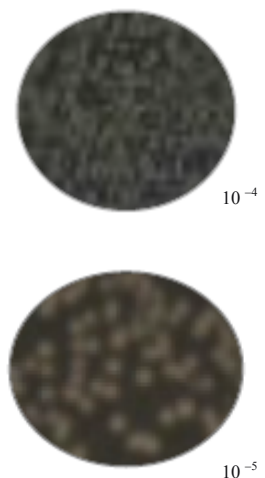
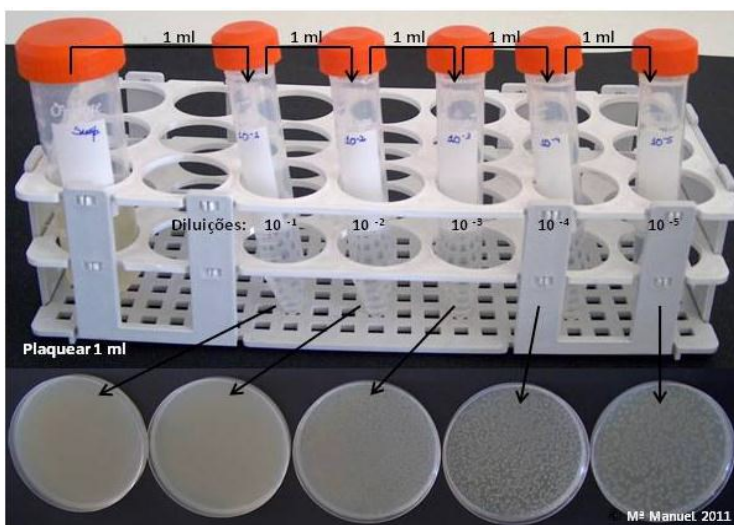


Figura 7. Método das diluições sucessivas e porme-nor de diluições.

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.

PROTOCOLO 5

Caracterização de colónias bacterianas

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.
- Registrar 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



Lembra-te!

Podem-se formar bactérias patogénicas

☺ Lembra os cuidados de assepsia.

☺ Anota os resultados sob a forma de uma tabela



Fotografa!

FORMA	Punctiforme	Circular	Filamentosa	Irregular	Rizóide	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).

PROTOCOLO 6

Coloração simples

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)

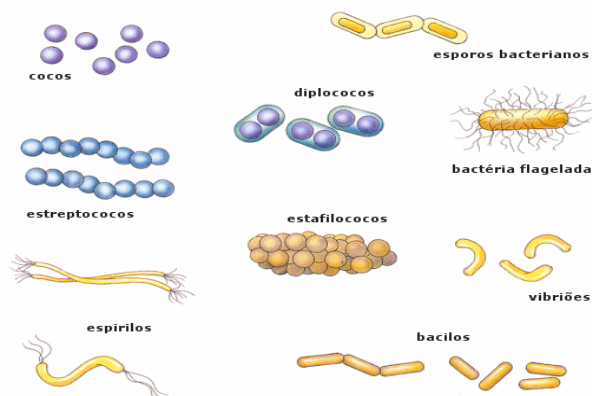


Figura 11. Formas que as bactérias podem apresentar (Técnicas Laboratoriais Biologia - Bloco1. Eva Marques *et al*, Porto Editora, 1999)



Figura 12. Técnica do esfregaço.



Figura 13. Técnica da irrigação.

😊 Relembra a constituição e funcionamento do microscópio.

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

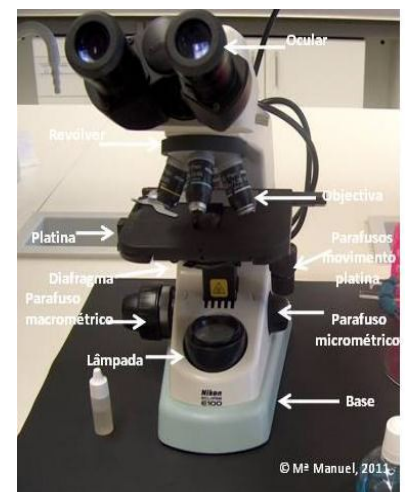


Figura 14. Constituição do microscópio óptico.

PROTOCOLO 7**Coloração de Gram****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/Biologiacelular/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.

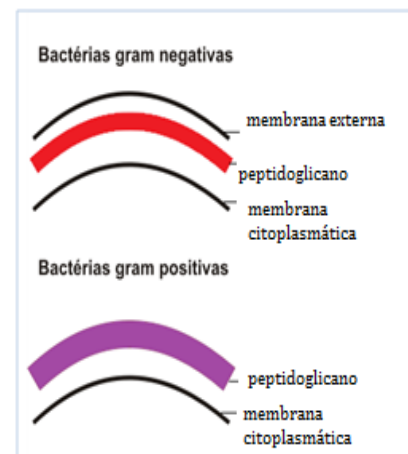


Figura 18. Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram - e Gram +.

PROTOCOLO 8**Constar a atividade das enzimas catalase e citocromo-oxidase****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 dihidrocloro 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 dihidrocloro) que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio o que resulta no aparecimento de um produto (indofenol) de cor púrpura.

catalase



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

PROTOCOLO 9**Preparação de material para observação de bactérias da mucosa bucal****INTRODUÇÃO**

A flora oral é constituída por bactérias, fungos e protozoários. Ela é responsável pela formação da placa dentária, um biofilme que se forma na superfície do dente e compreende diversos microrganismos, sobretudo bactérias. Numa cavidade oral humana existe uma flora residente constituída por bacilos e cocos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

OBJETIVOS

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Concluir com base em resultados obtidos em atividades experimentais.

PROCEDIMENTO

1ª Fase: Observação ao microscópio

- 1- Colocar uma gota de água destilada numa lâmina esterilizada;
- 2- Com uma espátula estéril (ou palito) raspar a superfície da parte interna da boca e/ou das gengivas;
- 3- Espalhar a amostra na gota de água, fazendo um esfregaço;
- 4- Fixar pelo calor e executar a coloração de Gram (Protocolo 7);
- 5- Observar ao microscópio, esquematizando a melhor observação.

2ª Fase: Isolamento de bactérias

- 1- Identificar uma caixa de Petri que contenha um meio de cultura;
- 2- Esfregar a superfície da parte interna da boca e/ou das gengivas, com uma zaragatoa;
- 3- Colocar o inóculo numa parte da caixa de Petri com meio de cultura e executar a técnica do riscado (Protocolo 3);
- 4- Inverter e incubar a 35°C durante um a dois dias;
- 5- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);
- 6- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células;
- 7- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:
 - Coloração de Gram (Protocolo 7);
 - Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas

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



Relembra os cuidados de assepsia.

Regista as diferenças de tamanho e de forma entre as bactérias e as células epiteliais.

Regista o tamanho e a forma das bactérias.

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram –



Fotografa!

Uma zaragatoa tem o aspecto de um cotonete gigante. Deve ser esterilizada.

Regista se houve ou não libertação de bolhas de ar.

Regista a mudança de cor.

PROTOCOLO 10

Presença de bactérias no ar

INTRODUÇÃO

A quantidade e o tipo de contaminantes existentes dentro de um espaço fechado estão relacionados com a existência de suspensões orgânicas e minerais no ar; com a temperatura e a humidade relativa; com as condições de manutenção dos sistemas de climatização existentes e com a higiene das instalações bem como número dos seus ocupantes.

Os microrganismos presentes no ar sedimentam a taxas variadas dependendo do tipo/tamanho das partículas em suspensão e do movimento do ar na sala. Embora a amostragem por sedimentação não determine diretamente o número de microrganismos presentes num dado volume de ar, é possível transformar o número de UFC/unidade de área obtidos em número de UFC/unidade de volume. Basta conhecer a área da caixa de Petri exposta ao ar e a razão entre o número de células na superfície e número de células no ar. Esta razão para ambientes com sedimentação espontânea é 23:1 (Morais, *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Concluir com base nos resultados obtidos na atividade experimental.

PROCEDIMENTO

1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes no ar de uma sala

- 1- Identificar uma caixa de Petri com o nome do meio de cultura e a data de elaboração;
- 2- Inocular o meio de cultura deixando as caixas de Petri abertas durante 30 minutos (cada grupo deve escolher dois locais para a amostragem);
- 3- Inverter e incubar as caixas de Petri a 30°C durante um a dois dias;
- 4- Registrar o número de UFC em cada caixa;
- 5- Calcular o número de UFC/ m³ do ar da sala;
- 6- Comparar o resultado obtido com a legislação e concluir.

2ª Fase : Observação e caracterização das bactérias presentes no ar

- 1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);

Valores máximos admissíveis a considerar na determinação da qualidade do ar interior (Decreto-Lei 79/2006)

	Nº UFC/m ³
Bactérias	500
Fungos	500
<i>Legionella</i>	100



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas

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



Relembra os cuidados de assepsia.

$$\text{nº UFC/m}^3 = \frac{\text{nº UFC caixa} \times 1}{\text{área caixa (m}^2\text{)} \times 23}$$

$$\text{Área (círculo)} = \pi \times R^2$$

Regista o tamanho e a forma das bactérias.

2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células.

3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:

- Coloração de Gram (Protocolo 7);
- Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).



Fotografa!

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram –

Regista se houve ou não libertação de bolhas de ar.

Regista a mudança de cor.

PROTOCOLO 11**Pesquisa de bactérias presente em superfícies****INTRODUÇÃO**

Para a determinação de bactérias aeróbias mesófilas totais utiliza-se uma zaragatoa humedecida para limpar uma superfície com área conhecida e inocula-se num meio de cultura apropriado. Não é um método para estudo da carga biológica porque apenas recolhe uma pequena proporção de microrganismos presentes. Contudo este método permite avaliar a qualidade de higiene de superfícies planas como chão, mesas, alguns equipamentos e roupas.

OBJETIVOS

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Concluir com base em resultados obtidos em atividades experimentais.

PROCEDIMENTO**1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes na superfície escolhida**

- 1- Identificar uma caixa de Petri com o nome do meio de cultura e a data de elaboração;
- 2- Percorrer uma área de tamanho conhecido, utilizando uma zaragatoa estéril;
- 3- Fazer um riscado no meio de cultura com a zaragatoa;
- 4- Inverter e incubar as caixas de Petri a 30°C durante um a dois dias;
- 5- Registrar o número de UFC em cada caixa;
- 6- Calcular o número de UFC por cm² da superfície estudada;
- 7- Comparar o resultado obtido com a legislação e concluir.

2ª Fase: Observação e caracterização das bactérias presentes na superfície escolhida

- 1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);
- 2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células.
- 3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:
 - Coloração de Gram (Protocolo 7);
 - Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

Bactéria mesófila: activa a temperaturas próximas da temperatura ambiente.

Embora não existam padrões estabelecidos, têm sido recomendados os seguintes critérios:

	Nº UFC/cm ²
Bom	0 a 25
Aceitável	26 - 50
Mau	> 50

Roupa limpa: considera-se que a presença de menos de 5 UFC por placa constitui um resultado aceitável.

O limite aceitável para mãos limpas é de menos de 5 UFC/dedo.



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas

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



Relembra os cuidados de assepsia.

$$\text{Área (círculo)} = \pi \times R^2$$



Fotografa!

Regista o tamanho, a forma das bactérias.

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram -

Regista se houve ou não libertação de bolhas de ar.

Regista a mudança de cor.

PROTOCOLO 12

Pesquisa de bactérias em alimentos

INTRODUÇÃO

Os alimentos e os microrganismos desenvolveram, desde sempre, uma interessante associação. Dependendo dos microrganismos presentes, a sua multiplicação pode resultar na conservação ou contaminação dos alimentos. Os alimentos não são produtos estéreis, como consequência eles podem ser veículos de microrganismos patogénicos ou das suas toxinas. As doenças de origem alimentar têm aumentado em todo o mundo, constituindo um dos mais importantes problemas de saúde pública a nível mundial.

A contaminação de alimentos por microrganismos ocorre maioritariamente durante o seu processo de fabrico, manipulação, transporte e contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos, embalagens, etc.) podendo ter consequências graves para a saúde pública.

Um processo para determinar a qualidade microbiológica de um alimento é a determinação de microrganismos num alimento, podendo esta ser feita através do método clássico da enumeração em placas contendo um meio de cultura específico.

OBJETIVOS

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Concluir com base nos resultados obtidos na atividade experimental.

PROCEDIMENTO

1ª Fase: Cálculo das bactérias presentes no alimento selecionado

- 1- Pesar 10 gramas de amostra do alimento escolhido;
- 2- Adicionar 90 ml de água peptonada, 0,1% de peptona (p/v) ou

Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos

Grupo de alimentos	Qualidade microbiológica UFC/g (30°C)		
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório
1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$
3	$\leq 10^4$	$> 10^4 \leq 10^6$	$> 10^6$

Grupo 1

Refeições/Sandes/Bolos
Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados.

Grupo 2

Refeições/Sandes/Bolos
Sobremesas doces cozinhadas com adição de ingredientes crus.

Grupo 3

Saladas/ Vegetais/Frutos crus.

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



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas



Relembra os cuidados de assepsia.



Fotografa!

solução salina (0,85% NaCl) de forma a obter uma diluição de 1/10;

3- Colocar a amostra num homogeneizador, de preferência um stomacher, ou alternativamente num gobelé, mexendo bem durante 4 a 5 minutos;

4- Deixar em repouso, durante cerca de 30 minutos;

5- Identificar tubos de ensaio e caixas de Petri com a data, o alimento e a diluição realizada;

6- Realizar as diluições necessárias em tubos com 9 ml de água peptonada e inocular os meios de cultura (Protocolo 4);

7- Inverter e incubar as placas durante 1 dia a 37°C;

8- Observar as placas e registar o número UFC por placa;

9- Calcular o número UFC multiplicando o número de colónias observado pelo fator de diluição correspondente a cada placa.

2ª Fase: Observação e caracterização das bactérias presentes no alimento selecionado

1- Caracterizar as colónias formadas na caixa de Petri (Protocolo 5);

2- Se necessário, fazer um riscado em placa (Protocolo 3) de forma a obter uma cultura pura das células.

3- Escolher uma colónia e caracterizar as suas células em relação à:

- Coloração de Gram (Protocolo 7);
- Atividade da catalase e da citocromo oxidase (Protocolo 8).

Multiplicar o número de colónias observado pelo fator diluição.

Contabilizar como 1ª diluição a junção de 90 ml de água peptonada aos 10 g de amostra

Regista o tamanho, a forma das bactérias.

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram –

Regista se houve ou não libertação de bolhas de ar.

Regista a mudança de cor.

PROTOCOLO 13

Produção de iogurte e cerveja

INTRODUÇÃO

Nem todos os microrganismos são patogénicos ou alteram os alimentos, alguns são utilizados pelo homem no fabrico de diferentes produtos. São o exemplo as leveduras, utilizadas no fabrico do pão e das bebidas alcoólicas, e as bactérias utilizadas na produção de produtos lácteos.

A fermentação láctica do leite, produzida por bactérias como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, transformam os açúcares em ácido láctico. Esta transformação origina uma diminuição do pH e a coagulação do leite, formando-se assim o iogurte (Figura 19).

A cerveja é um produto que se obtém através da fermentação alcoólica, produzida por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 19). As leveduras transformam os produtos da hidrólise do amido, presentes nos cereais, em etanol e CO₂.

Em ambas as fermentações os seres vivos obtêm a energia que necessitam, produzindo produtos de interesse para o Homem.

OBJETIVOS

- Executar autonomamente procedimentos experimentais.
- Realizar um registo correto das atividades experimentais.
- Concluir com base em resultados obtidos em atividades experimentais.

PROCEDIMENTO

1ª Fase: Produção de iogurte

- 1- Colocar 5 ml de leite pasteurizado em 2 tubos de ensaio;
- 2- Adicionar uma ansada de iogurte natural a um dos tubos e misturar bem ao outro tubo não se adiciona nada;
- 3- Incubar ambos os tubos durante cerca de 16 horas à temperatura de 46°C ou um dia à temperatura de 37°C;
- 4- Observar se o leite coagulou em ambos os tubos de ensaio;
- 5- Retirar uma amostra de ambos os tubos, fixar pelo calor e executar a coloração de Gram (Protocolo 7);
- 6- Observar ao microscópio, esquematizando a melhor observação.

Lactobacillus bulgaricus: forma de bastonete longo, aparecem frequentemente em cadeias.

Streptococcus thermophilus: forma esférica ou ovóides, ocorrem em pares ou cadeias longas.

Lactobacillus bulgaricus e *Streptococcus thermophilus*: células imóveis, não formam esporos e são microrganismos Gram +.

Saccharomyces cerevisiae são fungos unicelulares.

Amido



Maltose



Glicose

Bactérias termófilas: crescimento ótimo entre os 46 e 65°C.

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

☺ Lembra os cuidados de assepsia.

Qual a função do tubo ao qual não se adicionou iogurte?

Regista a forma e o arranjo dos microrganismos.

Identifica as bactérias.

Classifica as bactérias como Gram + ou Gram –

Microaerofília: ambiente com baixa concentração em O₂.

2ª Fase: Produção de cerveja

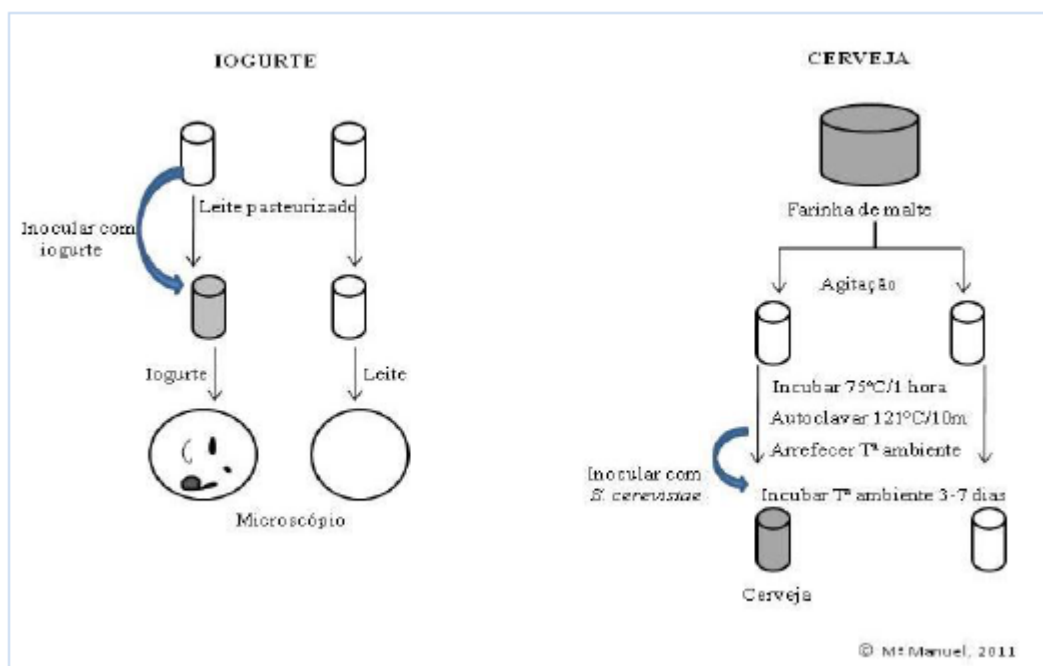
- 1- Preparar uma solução de farinha de malte a 5%, agitando bem;
- 2- Encher 2 tubos de ensaio, contendo tubos Durhan, até cima e tapar, gerando assim um ambiente microaerofílico;
- 3- Incubar os tubos a 75°C durante 1 hora, para que ocorra a hidrólise do amido;
- 4- Esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos para eliminar os possíveis microrganismos presentes;
- 5- Deixar arrefecer os tubos e inocular um dos tubos com *Saccharomyces cerevisiae*;
- 5- Incubar os 2 tubos à temperatura ambiente durante vários dias;
- 6- Observar os tubos Durhan para verificar se ocorreu a libertação de gás (CO₂);
- 7- No tubo de ensaio em que se observa a libertação de CO₂ realizar uma coloração simples e observar ao microscópio.

Qual a importância de eliminar possíveis microrganismos?

Preparar uma suspensão de 20 mg de levedura em 1 ml de solução salina.

Qual o significado da libertação de CO₂?

Como se apresentam as leveduras?



Fermentação láctica



Fermentação alcoólica



Figura 19. Representação esquemática da fermentação láctica e alcoólica.

PROTOCOLO 14**Recolha de amostras para análise microbiológica****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.

PROTOCOLO 15

Deteção e enumeração de bactérias

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

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

Águas balneares (águas doces, águas do mar).	Coliformes totais -VMR:500 UFC/100 ml; VMA: 10000/100 ml Coliformes fecais - VMR: 100 UFC/100 ml; VMA: 2000/100 ml Enterococos fecais - VMR: 100 UFC/100 ml Salmonelas - VMR: 0 UFC/11
Águas de piscinas, outros recintos com diversões aquáticas.	Coliformes totais- VMR: 0 UFC/100 ml; valor limite: 10/100 ml <i>Escherichia coli</i> - valor limite: 0 UFC/100 ml Enterococos fecais - valor limite: 0 UFC/100 ml <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, respectivamente.

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).

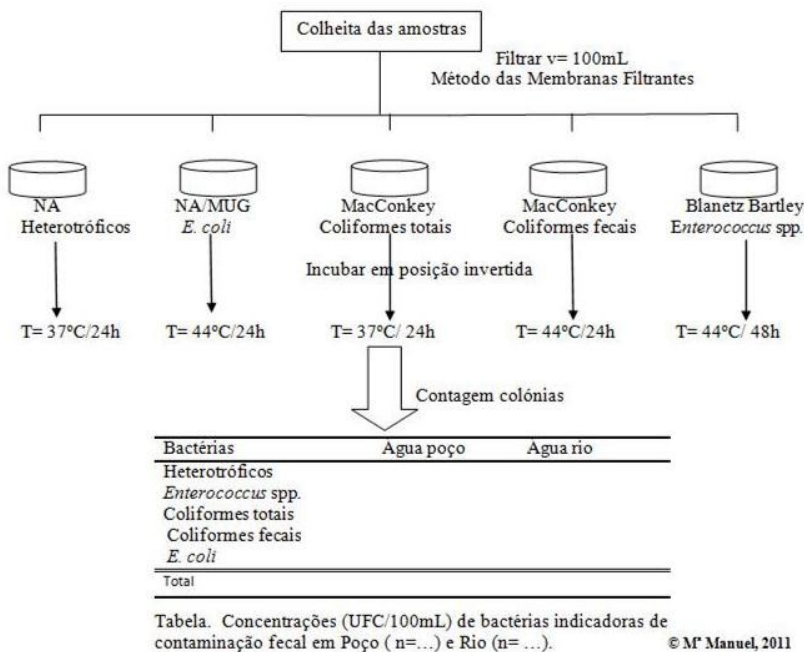


Figura 20. Esquema do trabalho a desenvolver.

PROTOCOLO 16**Isolamento de bactérias****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 21. Seleção de colónias.



Lembra-te!

Podem-se desenvolver bactérias patogénicas



Relembra os cuidados de assepsia.



Fotografa!

PROTOCOLO 17

Teste sensibilidade a antibióticos

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;

Antibiótico: termo inicialmente usado para substâncias de origem natural como as penicilinas (produzidas por fungos do género *Penicillium*) ou estreptomocina (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

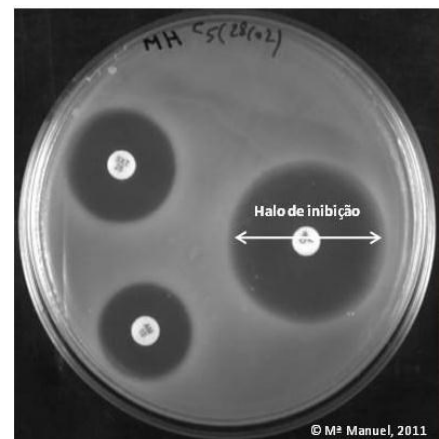


Figura 22. Técnica de Kirby-Bauer.



Fotografa!

Os discos de antibióticos usados dependem das bactérias a testar.

Enterococos: ampicilina, penicilina e vancomicina

E. coli: Penicilinas, Cefalosporinas, ciprofloxacina,

Salmonella: ampicilina, estreptomocina, tetraciclina, sulfametoxazol

4- Colocar os discos de antibióticos, no máximo 4 por placa, de acordo com as bactérias selecionadas;

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).

Enterobacteriaceae

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

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

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>.

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

AÇÕES DE FORMAÇÃO: REFLEXÕES

(Micro)Biologia para a sala de aula: aplicações práticas em laboratório

Pesquisa de Bactérias na mucosa bucal

Maria João Marinho Costa Dias de Carvalho

Fernanda Maria da Silva Correia Jorge

Resumo

A História humana não se compadece de estatismo, pelo contrário é feita de constantes inconformidades de espírito que motivam descobertas e influenciam, de diferentes formas, a espécie humana. Desde sempre, que o objetivo humano foi a persecução de condições de vida que lhe permitissem prolongar a sua estadia no nosso planeta em condições favoráveis, mas para isso seria necessário penetrar numa dimensão inferior, caracterizada por um padrão de grandezas muito distintas.

Através da pesquisa efetuada e descrita no presente trabalho propomo-nos identificar as bactérias presentes na nossa flora bucal indígena utilizando para isso técnicas diferenciadas, como por exemplo, o cultivo dos microrganismos recolhidos, quer por inoculação, quer pela técnica do riscado, em meios de cultura preparados para o efeito, o isolamento por riscado ou por diluições sucessivas, caracterização das colónias obtidas, coloração simples e diferenciada (técnica de Gram), constatação da atividade das enzimas catalase e citocromo oxidase e pelo teste de sensibilidade a antibióticos.

A utilização de diferentes técnicas microbiológicas permitirá não só a identificação de alguns dos microrganismos presentes na amostra utilizada, como também, recriar um ambiente laboratorial seguro, capaz de se transpor para a sala de aula e outros níveis de ensino replicando técnicas e lembrando conceitos fundamentais para a fomentação da componente prática das disciplinas de Ciências.

Palavras-chave: Microbiologia, mucosa bucal, flora indígena, técnicas microbiológicas

Abstract

The human history is not static; on the contrary, it consists of constant inconformity of mind which leads to discoveries which influence, in different ways, the human species. The human aim has always been the pursuit of life conditions which could enable the extension of Man's stay on our planet in favorable conditions, but this would require penetrating a lower dimension, characterized by a pattern of varied magnitudes.

Through the research carried out and described in this paper, we intend to identify the bacteria present in our indigenous oral flora thus using different techniques, for example, cultivation of microorganisms collected either by inoculation or by using the streaking technique, in culture media intentionally prepared, the isolation by streaking or by successive dilutions, characterization of the colonies obtained, simple and differential staining (Gram technique), observation of the catalase and cytochrome oxidase enzymes and the test of sensitivity to antibiotics.

The use of different microbiological techniques will allow not only to identify some of the microorganisms present in the sample used but also to recreate a safe laboratory environment, which will be able to be incorporated

into the classroom and into other school levels replicating techniques and recalling key concepts for the fostering of the practical component of the science disciplines.

Keywords: Microbiology, buccal mucosa, indigenous flora, microbiological techniques

1. Introdução

A Microbiologia, tem como principal o objeto de estudo microrganismos microscópicos, isolados ou associados em colónias, constituindo-se como células ou não, como é o caso dos vírus e que pertencem a classes e reinos diferentes. A importância desta ciência, relativamente recente, advém da imensa disseminação destes organismos e consequentemente do enorme impacto sobre a vida de todos os seres planetários. Apesar de ser recente tornou-se imperativo que a Microbiologia se desconstruísse em diferentes ramos tais como a Bacteriologia, Virologia, Parasitologia ou mesmo a Micologia, por forma a dar resposta às múltiplas facetas do mundo microbiano. Esta característica multifacetada da Microbiologia é partilhada pela sua aplicabilidade dando origem a diferentes especialidade que vão desde a medicina, à indústria alimentar, farmacêutica, agrícola, entre outras.

A própria evolução da tecnologia impulsiona o aparecimento desta parafernália de áreas científicas especializadas num micromundo. Se por um lado a sistemática das espécies, num passado não muito longínquo, escusava grandes técnicas e raciocínios o aparecimento do microscópio, apesar de rudimentar, impõe um ritmo e um rumo de investigação diferente e totalmente novo que abriria as portas à Microbiologia. Desde a primeira observação dos “animálculos” do alemão Antony van Leeuwenhoek, entre 1673 e 1723, que se verificou a existência de seres vivos microscópicos, por exemplo, na mucosa bucal, fezes, saliva, indiciando que o organismo humano seria um dos meios de sobrevivência destas pequenas espécies. Outra das importantes contribuições dos estudos microbiológicos é sem dúvida a questão da geração espontânea resolvida por Louis Pasteur ao explicar a contaminação feita por microrganismos aéreos de soluções estéreis, verificando-se a versatilidade de ambientes nos quais seríamos capazes de encontrar microrganismos, ou mesmo da importância das técnicas de assepsia, fermentação e pasteurização. Ou com Robert Koch, no que se refere ao papel desempenhado pelas bactérias na origem e propagação de doenças através dos seus postulados, contribuindo grandemente para o diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças de origem microbiana ao identificar e isolar os agentes patogénicos. A base da quimioterapia deve-se, igualmente à microbiologia que ao utilizar substâncias químicas produzidas por bactérias e vírus (antibióticos), resultantes das investigações de Paul Ehrlich, Alexander Fleming, Howard W. Florey e Ernst Chain permitem o tratamento e uma drástica diminuição de incidência de muitas patologias.

Apesar das suas reduzidas dimensões o impacto que provoca, por exemplo, na vida humana é razão motora para o ampliar de uma ciência já vasta por natureza. Desde a deterioração de objetos, passando pela produção de substâncias químicas imprescindíveis à medicina moderna, causa de patologias diversas, processos de fermentação de vinho e cerveja, utilização na indústria da panificação e de produção de leite, podemos encontrar estes microrganismos na globalidade dos nossos ecossistemas e na totalidade do nosso próprio organismo. A sua extensão é tal, que se estima que o seu valor seja próximo dos 5×10^{13} no planeta, que se constituam como 90% da biomassa da biosfera terrestre¹ e cerca de 90% das células que possuímos no nosso corpo (Brooks *et al*, 2010).

1.1. Flora bacteriana bucal

O ecossistema bucal reveste-se de algumas particularidades quando comparado com outros ecossistemas exis-

¹ excluindo-se as células de celulose.

tentes no corpo humano. Enquanto, cada um dos outros ecossistemas microbianos humanos (pele, mucosa nasal, vaginal e intestinal, por exemplo) possui uma flora específica, dadas as suas condições de pH, teciduais, de recetores de aderência, humidade, disponibilidade em oxigénio, bem como um conjunto de outros fatores, que os leva a serem colonizados apenas num local, na boca assistimos a uma diversidade de ambientes, na mesma cavidade, que resultam em diferentes micro-ecossistemas que, por sua vez, determinam a instalação de diferentes populações microbianas.

Nesta cavidade poderemos, então, encontrar uma grande diversidade flora associada a diferentes regiões como por exemplo relacionadas à mucosa lisa, à mucosa do dorso lingual, à superfície dental sadia, à superfície dental cariada, ao sulco gengival sadio, bem com à bolsa periodontal (De Lorenzo, 2010).

Socransky e Haffajee (2002) relataram que, na boca, existem aproximadamente 350 espécies bacterianas já cultivadas e mais de 200 que foram reconhecidas por métodos genéticos, rivalizando com a flora bacteriana que poderemos encontrar no intestino humano. Esta flora pode ser classificada como autóctone (indígena) ou alóctone (exógena) consoante a sua proporção ultrapassa ou não 1,0% do total de microrganismos que aí poderemos encontrar.

A flora bacteriana que podemos encontrar na boca varia ao longo do processo de crescimento. Ao longo da vida intra-uterina não existem microrganismos bucais e só durante o processo de expulsão é que se instalam os primeiros, embora com carácter transitório, advindos do canal vaginal da mãe (estreptococos, lactobacilos, difteróides, coliformes, leveduras como *Candida albicans* e alguns vírus e protozoários), algumas horas após o nascimento verifica-se a instalação de bactérias provenientes das pessoas que rodeiam o bebé, havendo predominância para microrganismos aeróbios e anaeróbios (*Streptococcus salivarius*, do mesmo sorotipo encontrado na boca da mãe, *S. oralis* e *S. mitis*). No primeiro ano de vida, a maior parte dos microrganismos bucais são constituídos por *Streptococcus spp*, principalmente da espécie *S. salivarius*, podendo ainda encontrarem-se exemplares de estafilococos, *Veillonella spp* e *Neisseria spp*. A erupção dos dentes marca uma nova fase na evolução da instalação da flora bacteriana visto dar-se o aparecimento de mais duas superfícies geradoras de ambientes diferentes dos anteriores: a superfície dental e o sulco gengival. Na primeira superfície verificasse a fixação de bactérias como *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis* e algumas espécies de Actinomyces, enquanto no sulco gengival, onde a oxigenação é baixa, verifica-se a instalação de bactérias anaeróbias estritas, como por exemplo as periodontopatogénicas: *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, principalmente a partir da puberdade, devido ao aumento da concentração das hormonas sexuais (De Lorenzo, 2010).

Na cavidade oral, as bactérias indígenas são muitas vezes associadas a duas das principais doenças orais: as cáries e as doenças periodontais. Estas doenças parecem surgir na sequência de um desequilíbrio nos microrganismos residentes, conduzindo ao aparecimento de bactérias potencialmente patogénicas (Marcotte e Lavoie, 1998).

Um estudo realizado em 1996, por Alan Cooper, no qual que se analisou a placa bacteriana extraída de uma mandíbula com 1000 anos, inspirou uma análise comparativa entre as comunidades bacterianas orais humanas. Assim sendo, verificou-se quando estabelecida esta comparação que, a qualidade das bactérias existentes na cavidade oral humana sofreu variações ao longo do tempo, como consequência dos hábitos alimentares que caracterizaram os humanos em diferentes fases da História da Humanidade. Da mandíbula encontrada foi retirado biofilme mineralizado, originalmente, utilizado para se concluir acerca dos hábitos alimentares ancestrais, no entanto, através da microscopia de varrimento verificou-se a existência de microrganismos fossilizados que foram utilizados numa pesquisa que pretendia caracterizar a flora microbiana bucal dos seres humanos desde há 8000 anos. O principal problema residia na contaminação da amostra por bactérias do solo e do próprio laboratório. No entanto, os resultados obtidos excluíram estes dois tipos de contaminação pelo que os microrganismos encontrados foram validados para flora bacteriana bucal. Analisadas as várias amostras provenientes de 34 esqueletos europeus que viveram no intervalo compreendido ente os 5400 e 7800 anos (caçadores-recoletores do Mesolítico) e até ao final da Idade Média, verificou-se que, os caçadores-recoletores possuíam uma comunidade diversificada de bactérias orais, cuja maioria não está associada às doenças orais atuais, no entanto a partir do neolítico e com o incremento do consumo de cereais selecionados que marcara o alvore-

cer da agricultura (cevada e trigo), constatou-se uma redução significativa na diversidade bacteriana, e um aumento nas que estão associadas a patologias, nomeadamente cárie dentária e doença periodontal. Esta modificação na flora bacteriana prender-se-ia com o facto da diminuição da diversidade microbiana contribuir, igualmente, para a diminuição da resistência contra bactérias patogénicas.

Desde este período até ao final da Revolução Industrial não se verificam alterações significativas da flora microbiana, no entanto a partir deste período constata-se que o aumento do consumo de hidratos de carbono concentrados e açúcares refinados leva a que a diversidade bacteriana diminua, drasticamente, aumentando o poder bacteriano patogénico motivado pela mudança de dieta. Contrapondo-se à opinião de Cooper, William Wade, um microbiologista oral do King's College London Dental Institute, reforça a importância técnica do estudo, no entanto, apresenta uma justificação diferente, que se prende com as modificações ocorridas ao nível da higiene oral. Segundo este investigador, as práticas atuais promovem a remoção constante da placa dentária e consequentemente a constituição de uma comunidade microbiana imatura que proporciona um ambiente privilegiado para a instalação de bactérias patogénicas, como por exemplo os streptococos.

Com a finalidade de se averiguar a existência de flora bucal utilizando técnicas acessíveis à sala de aula, aplicaram-se várias técnicas como por exemplo a desinfecção, a preparação de meios de cultura, cultivo dos microrganismos recolhidos, caracterização microscópica, coloração simples e de Gram, constatação da atividade enzimática, nomeadamente catalase e citocromo oxidase e teste de sensibilidade a antibióticos.

Ao iniciar um trabalho experimental em que se manipularam agentes microbianos desconhecidos, apesar da seleção da amostra a utilizar não contemplar agentes de risco patológico elevado, deveremos procurar trabalhar sempre em condições de assepsia a fim de impedir a passagem biunívoca dos agentes microbianos. É tão importante impedir a nossa contaminação como também coibir a contaminação do meio/amostra com que nos propomos trabalhar para caracterizar ao nível microbiano. A manutenção de características assépticas pode ser conseguida, em trabalhos práticos com acesso a menos material, utilizando uma lamparina acesa trabalhando, sempre, perto da sua chama e desinfetando a bancada de trabalho com álcool etílico a 96%.

As técnicas utilizadas ao longo do trabalho prático, poderá ser adaptada à sua utilização em contexto de sala de aula, a fim de poder contribuir para incrementar o gosto pelas ciências experimentais, bem como o domínio das técnicas mais básicas a utilizar em laboratório.

2. Objetivos

- Utilizar técnicas de microbiologia compatíveis com a utilização em contexto de sala de aula (condições de assepsia e meios de cultura);
- Identificar a flora microbiana presente na mucosa bucal;
- Selecionar técnicas adequadas à pesquisa de material microbiano tendo em conta o ambiente;
- Executar autonomamente procedimentos experimentais;
- Observar, microscopicamente, bactérias;
- Identificar bactérias;
- Concluir com base em resultados obtidos em atividades experimentais;
- Inferir os perigos para a saúde individual e pública da contaminação bacteriológica;
- Prever consequências do aumento de bactérias resistentes a antibióticos;
- Aplicar as regras de (bio)segurança no laboratório;

- Organizar o trabalho laboratorial;
- Identificar o material de laboratório;
- Conhecer o funcionamento e utilização dos instrumentos e materiais de laboratório;
- Pesquisar informação relacionada com a temática do trabalho prático.

3. Material e métodos

Os materiais e métodos utilizados constam dos protocolos distribuídos pela formadora de distribuídos em suporte informático, tendo-se desenvolvido os protocolos: número um – “Preparação e distribuição de um meio de cultura” tendo-se preparado meios de cultura Nutrient Agar (NA) – meio não-seletivo - e MacConkey (MC) – meio seletivo e diferencial. Outro dos protocolos utilizados foi o protocolo dois, respeitante ao cultivo de microrganismos nos diferentes meios de cultura, utilizando, para o efeito, os procedimentos constantes do protocolo nove – “Preparação de material para a observação de bactérias da mucosa bucal”.

A fim de se experimentarem técnicas de isolamento conducentes à obtenção de culturas puras, utilizámos o protocolo três – “Isolamento por riscado em placa” - e o protocolo quatro - “Isolamento por diluições sucessivas”. Para que se caracterizassem as colónias obtidas utilizou-se o protocolo número cinco – “Caracterização de colónias”, tendo-se feito coloração simples e de Gram a fim de melhor se proceder a uma caracterização mais precisa, para esse efeito, seguiram-se os protocolos número seis – “Coloração Simples” - e sete – “Coloração Gram”.

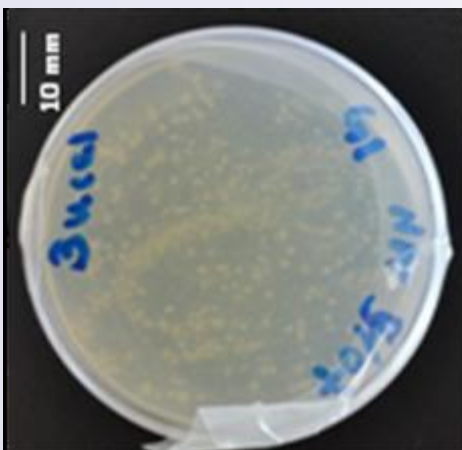
Realizaram-se ainda os protocolos oito – “Constatar a atividade das enzimas catalase e citocromo oxidase” e o protocolo dezassete referente ao “Teste de sensibilidade a antibióticos”.

4. Resultados

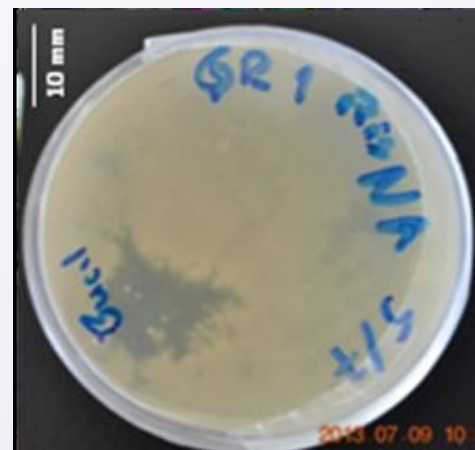
Da aplicação dos procedimentos constantes no ponto três do qual resultou a atividade experimental de pesquisa de bactérias da mucosa bucal obtiveram-se os seguintes resultados:

4.1. Inoculação em meios de cultura

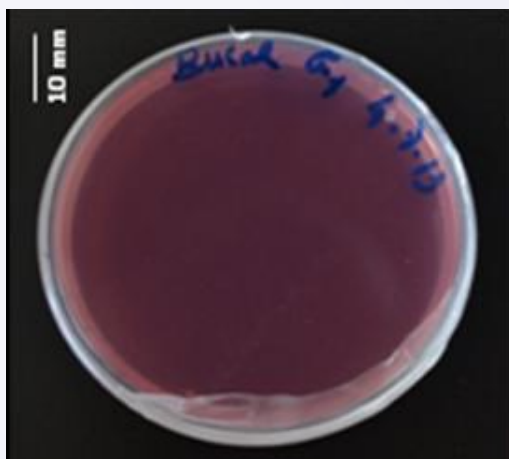
Após inoculação das bactérias recolhidas da mucosa bucal e incubação a cerca de 37°C, e estufa, durante 72 horas, e meio NA (Nutriente Agar) e MC (MacConkey) verificou-se a proliferação de colónias nos meios NA e a ausência de colónias em meio MC.



Fotografia 1 – Proliferação de colónias em meio NA (inoculação)



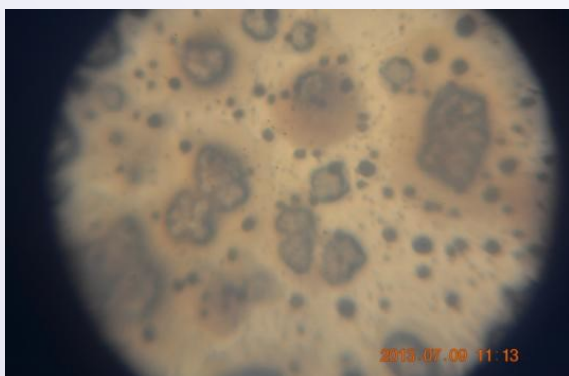
Fotografia 2 – Proliferação de colónias em meio NA (Riscado em placa)



Fotografia 3 – Proliferação de colónias em meio MC (Riscado em placa)

4.2. Identificação das bactérias

Selecionadas as placas que obtiveram crescimento microbiológico, procurou-se um local no qual as colónias estivessem mais isoladas, a fim de se proceder a uma observação à lupa binocular (fotografia 4) e mediante as características explanadas em grelha, no protocolo número cinco, proceder-se à sua identificação. Desta feita verificaram-se os resultados constantes da tabela nº 1.



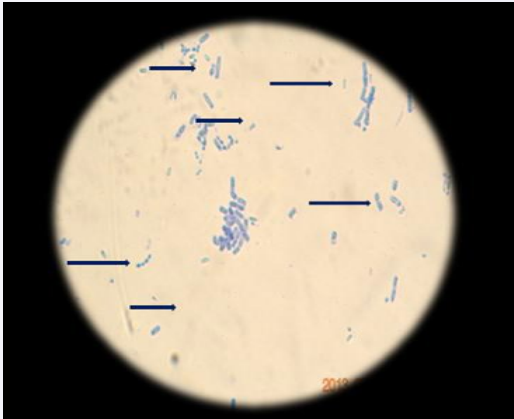
Fotografia 4 – Observação à lupa binocular das colónias obtidas por cultura em inoculação, em meio NA. (Ampliação aproximada utilizada: 300 x - desconsiderando zoom da máquina fotográfica)

Forma	Circular
Elevação	Elevada/Convexa
Margem	Ondulada
Superfície/Textura	Lisa
Brilho	Mate
Consistência	Viscosa
Dimensão	1 mm

Tabela 1 – Características das colónias obtidas por cultura em inoculação, em meio NA.

4.3. Identificação das bactérias por coloração simples

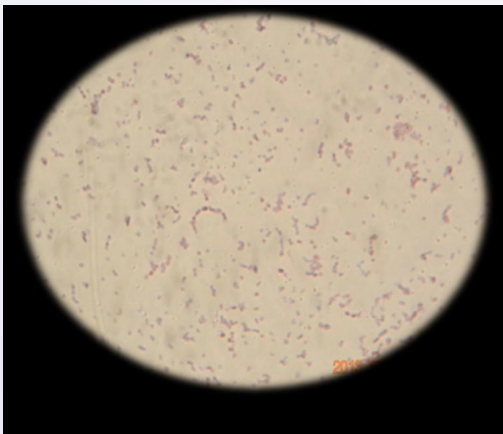
Aplicando-se o método de coloração simples e utilizando a técnica do esfregaço e coloração por irrigação, com azul de metileno, obtivemos uma melhor visualização das bactérias presentes nas culturas identificando, principalmente, diplococos (1), bacilos (2) e estreptococos (3) (Fotografia 5).



Fotografia 5 – Observação microscópica de bactérias obtidas por cultura em inoculação, em meio NA, coradas com azul de metileno. (Ampliação aproximada utilizada: 1000 x - desconsiderando zoom da máquina fotográfica)

4.4. Identificação das bactérias por coloração diferencial – Técnica de Gram

Aplicando a técnica de Gram, que permite uma diferenciação entre Gram positivas e negativas, verificámos a ocorrência de bactérias gram negativas, que coraram de vermelho (fotografia 6).



Fotografia 6 – Observação microscópica de bactérias obtidas por cultura em inoculação, em meio NA, coradas com aa técnica de Gram. (Ampliação aproximada utilizada: 1000 x - desconsiderando zoom da máquina fotográfica)

4.5. Atividade Enzimática – catalase e citocromo oxidase

Outro dos trabalhos práticos consistiu na pesquisa das enzimas catálase e citocromo oxidase, tendo-se verificado uma tênue presença de ambas as enzimas na flora bucal utilizada como amostra. No teste da catálase verificou-se uma pequena efervescência (fotografia 7) e no teste da citocromo oxidase a presença de uma pequena mancha púrpura (fotografia 8).



Fotografia 7 – Teste da Catalase



Fotografia 8 – Teste da Citocromo Oxidase

4.6. Teste da sensibilidade a antibióticos (Técnica de Kirby-Bauer)

A fim de constatar a sensibilidade da microflora bucal a diferentes antibióticos, Ampicilina (concentração de 10 μ g), Vancomicina (concentração de 5 μ g) e Cotrimoxazole (concentração de 25 μ g), utilizámos a Técnica de Kirby-Bauer, tendo obtido resultados observáveis, apenas, no teste com Cotrimoxazole que dimanam num halo de 9mm (fotografia 9).



Fotografia 9 – Halo de sensibilidade (9mm) ao antibiótico Cotrimoxazole

5. Discussão dos resultados

Analisando os resultados obtidos da atividade experimental “Pesquisa de bactérias na mucosa bucal” verificou-se que as bactérias que proliferaram nas culturas NA não permitiram a sua identificação, dado que se trata de um meio não seletivo, no entanto, e cumprindo o objetivo, permitiram obter várias colónias levando à obtenção de amostras para a realização dos procedimentos subsequentes. Com a finalidade de se obterem colónias isoladas utilizou-se a técnica do riscado e placa, não obstante, verificou-se uma cultura profusa, também no riscado em placa, que não cumpriu o objetivo inicial de obtenção isolada de colónias cada vez mais puras.

Uma das razões prender-se-á com o intervalo de tempo concedido para a realização do trabalho prático que limitou a realização sucessiva de riscados até à obtenção de culturas cada vez isoladas e consequentemente mais puras. Outro dos factores poderá prender-se com o facto da temperatura na estufa se ter alterado, durante o intervalo de espera de crescimento das colónias, por falha de energia e as elevadas temperaturas ambientais exteriores verificadas. No entanto, o treino das técnicas, a capacidade crítica e de remediação de situações constitui-se como uma aprendizagem extremamente útil dadas as condições reais que temos nas escolas onde replicaremos estas técnicas, permitindo antever problemas procedimentais, bem como a sua resolução.

Relativamente à cultura em meio MC verificou-se que não se registou o crescimento de qualquer colónia o que evidencia a ausência de bactérias entéricas, quer coliformes, quer não coliformes, na mucosa bucal utilizada como amostra.

No que concerne à identificação das colónias utilizando a lupa binocular e os critérios tais como: elevação,

forma, margem, cor, superfície-textura, brilho, opacidade, tamanho e consistência verificámos a existência de colónias com forma circular, elevadas, convexas, com margem ondulada, de superfície lisa, mate, de consistência viscos e com tamanho médio de 1 mm. Para esta análise à lupa binocular procurou-se um local da placa onde as colónias se apresentassem mais espaçadas, por forma a se distinguirem melhor as suas características. Mais uma vez, o facto das colónias se encontrarem bastante próximas dificultou a sua caracterização.

Relativamente à coloração simples das bactérias verificou-se que a utilização da técnica do esfregaço, permitiu a obtenção de uma película fina de bactérias e assim a sua separação ao longo da lâmina delgada, bem como o contraste entre o meio e as bactérias resultante da coloração com azul de metileno, possibilitou a distinção do material bacteriano consoante a sua forma e associação. Verificou-se, desta forma, e utilizando a objetiva de imersão, a existência de diplococos (associação de duas células esféricas), estreptococos (colónia de cocos agrupados em forma de cadeia) e bacilos (bactérias em forma de bastonete).

Utilizando a coloração diferencial e seguindo a técnica de Gram, que utiliza as diferenças de espessura da parede de peptoglicano presente nas bactérias, aplicámos dois corantes (a safranina e o violeta de cristal) obtendo uma coloração azul/violeta, identificativa das bactérias Gram positivas, e possibilitada pela utilização de etanol que permite a desidratação das bactérias e a consequente retenção do complexo violeta de cristal-iodo permitindo a manutenção da cor azul/violeta; simultaneamente, a mesma aplicação do etanol promove, nas bactérias Gram-positivas, a remoção dos lípidos da membrana externa da parede celular, aumentando a sua permeabilidade e a, consequente, saída do complexo violeta cristal-iodo ficando as bactérias descoradas e recetivas ao corante seguinte, a safranina, que lhes confere uma cor vermelha. Esta coloração diferencial permite que na observação microscópica, com a objetiva 100x, se faça uma rápida distinção entre estes dois tipos de bactérias que não é possível distinguir utilizando uma coloração simples.

A fim de se averiguar outra das características diferenciadoras das bactérias procedeu-se à pesquisa da atividade enzimática das bactérias, nomeadamente, no que se refere à presença da catalase e da citocromo-oxidase. Estas duas enzimas, quando presentes, identificam a existência de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, uma vez que são utilizadas na desintoxicação celular de radicais de O₂ originados pelo metabolismo dos organismos em ambientes com oxigénio. Algumas bactérias são capazes de produzir a enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) liberando água e oxigénio molecular (O₂) e que se distingue pela efervescência produzida quando se coloca H₂O₂ na amostra bacteriana.

As bactérias que produzem a enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de eletrões denominado sistema citocromo oxidase. Neste sistema, os aceitadores de eletrões naturais podem ser substituídos por substratos artificiais (corante – tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato) que produzem indofenol, identificado pela sua cor púrpura (Gomes, 2011). No nosso caso verificou-se uma ténue reação em ambos os casos, o que identificou uma baixa presença de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos. Dada a existência de vários ambientes na flora bucal e consequentemente de microrganismos com diferentes características, no que concerne a sua tolerância à presença de oxigénio, os resultados obtidos não são objeto de desconsideração dado que não se desviam do que se esperaria neste tipo de pesquisa.

No que se refere à sensibilidade aos antibióticos verificou-se que nos testes com a Ampicilina e a Vancomicina não se observaram a formação de halos revelando-se tolerância da flora bucal a estes antibióticos. De considerar, no entanto, que os discos contento os respetivos antibióticos mudaram de local pelo que ponderamos, igualmente, que os resultados possam ter sido influenciados por esta alteração na metodologia. A fim de se confirmar esta tolerância, o procedimento deveria ter sido repetido até se conseguir a perfeita imobilidade dos discos e a formação ou não de um halo de sensibilidade. No caso dos dois antibióticos anteriores poder-se-ia repetir o processo, utilizando diferentes concentrações de antibiótico dado que a tolerância registada poder-se-ia verificar não só para o tipo de antibiótico como também para a concentração utilizada. Relativamente ao antibiótico Cotrimoxazole verificou-se a formação

de um halo com 9mm revelando um sensibilidade da flora bucal a este tipo de antibiótico, podendo ser utilizado na destruição do tipo de microrganismos que encontramos na cavidade bucal.

De salientar que a identificação conclusiva do tipo de microrganismos presentes na amostra de flora bucal requeriam repetição das metodologias utilizadas, utilização de outros meios de cultura diferenciais, bem como a sua identificação genética, apenas possível noutro tipo de laboratório e mediante a utilização de outras técnicas que não se compadecem de um laboratório escolar.

6. Conclusão

As técnicas microbiológicas permitem-nos a identificação de microrganismos existentes em diferentes ambientes. Quer seja a análise de superfícies diversas, que seja a pesquisa dos microrganismos que podemos encontrar no nosso organismo ou mesmo em alimentos que consumimos quotidianamente, poderemos utilizar estas técnicas para simplesmente detetar a sua presença e desta forma iniciar os nossos alunos num mundo de dimensões microscópicas que não pode ser alienado dada a sua importância. Poderá constituir-se como uma iniciação ao trabalho de laboratório, como também ao despertar para as Ciências Experimentais promovendo a sua importância e as suas mais diversas vertentes. No caso do trabalho experimental realizado, verifica-se a possibilidade da sua implementação em contexto sala de aula mediante a adaptação às condições existentes, mas também se constituiu como uma chamada de atenção para a importância do equipamento dos laboratórios escolares como fator de promoção do ensino das ciências. Tendo sempre presente os cuidados de assepsia e as regras de segurança, os trabalhos experimentais deste género constituem-se como uma mais-valia no despertar e no desenvolvimento do raciocínio científico.

Referências

- Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A.; 2010. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. Vigésima quinta edição. The MacGraw-Hills Company.
- De Lorenzo, J. L.; 2010. *Microbiologia, Ecologia e Imunologia Aplicadas à Clínica Odontológica*. Primeira edição. Editora Atheneu.
- Marcotte, H.; Lavoie, M. C.; 1998. *Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. March 1998 vol. 62 no. 1 71-109.
- Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; 2002. *Dental biofilms: difficult therapeutic targets*. Periodontology 2000, vol.28, 2002, 12-55.
- Gomes, M.M.; 2011. *Projeto no ensino da (Micro)Biologia. Um guia do professor com sugestões de atividades em Microbiologia*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Influência da temperatura na germinação de plantas

Influence of temperature on plants germination

M.A.P. Azevedo

Resumo

Todas as espécies vegetais têm enorme dependência dos fatores abióticos no seu processo de germinação e desenvolvimento. O trabalho teve como objetivo o estudo da influência da temperatura, enquanto fator abiótico, na germinação das plantas. Para a realização do processo experimental as sementes foram acondicionadas em caixas de Petri e posteriormente envoltas em papel de alumínio, de maneira a que não houvesse presença de luz. De seguida foram distribuídas por três meios com condições diferentes de temperatura. Foram os resultados obtidos na atividade que permitiram a realização do estudo que incidiu especificamente sobre 4 espécies distintas: o milho (*Zea mays*), a salsa (*Petroselinum crispum*), o girassol (*Helianthus annuus*), e a alface (*Lactuca sativa*).

Abstract

All plant species have a huge dependence of abiotic factors in their germination and development. The study aimed to study the influence of temperature, while abiotic factor, in plant germination. To conduct the experimental process, the seeds were placed in Petri dishes and then wrapped in aluminum foil, so that there was no presence of light. Then they were distributed by three places with different temperature. Were the results obtained in the activity that allowed the study that focused specifically on four distinct species: corn (*Zea mays*), parsley (*Petroselinum crispum*), sunflower (*Helianthus annuus*) and lettuce (*Lactuca sativa*).

Palavras-chave: Temperatura, Germinação, Fatores Abióticos

Key words: Temperature, Germination, Abiotic Factors

Introdução

Os fatores abióticos são todas as influências físicas e químicas do meio ambiente que os seres vivos podem receber. Estes fatores influenciam a atividade, crescimento, distribuição e características que os seres apresentam. É, portanto a variação dos fatores abióticos que determina uma grande variedade de ambientes. A pressão, a luz, a salinidade, a humidade, a temperatura, o solo, o pH, a chuva, o vento e o clima são exemplos de fatores abióticos que têm efeitos distintos na natureza.

O termo germinação é associado ao processo inicial do crescimento de uma planta. Por sua vez, este processo é influenciado pelo meio. Em situações de ambientes adversos, as probabilidades de se dar a germinação da planta são extremamente reduzidas. Para ocorrer, as condições do meio devem ser adequadas. Os fatores abióticos constituem portanto, um papel essencial para que ocorra a germinação de uma planta.

As sementes de alface apresentam grande sensibilidade às variações na humidade e temperatura do meio onde germinam. Uma das espécies utilizadas foi *Lactuca sativa*, e é considerada de germinação rápida quando este processo se sucede em ambientes entre 5 e 20°C. Os fatores abióticos que têm influência direta sobre a sua germinação são essencialmente a temperatura, luz, água e oxigénio. A temperatura afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo. O girassol (*Helianthus annuus*) é uma planta cuja germinação é considerada lenta, podendo demorar entre 3 a 6 semanas para ocorrer o processo. A temperatura do solo deve ser, no mínimo, 10° C para que se dê uma boa germinação. Temperaturas inferiores retardam a germinação. Relativamente ao crescimento vegetativo, temperaturas inferiores a 8°C retar-

dam o desenvolvimento. A temperatura ótima varia entre 18°C a 22°C. Outra das plantas utilizadas foi o milho (*Zea mays*). Esta espécie, bastante vulgar na gastronomia mundial, é considerada de germinação rápida, sendo que o processo leva apenas cerca de 2 dias. A temperatura ideal de germinação é de 18°C a 35°C. A última espécie em estudo foi a salsa (*Petroselinum crispum*), uma erva aromática muito popular na gastronomia mundial. A temperatura ideal de germinação é entre 22°C e 30°C. No caso da salsa, o processo de germinação é considerado lento, visto que pode ocorrer de quatro a seis semanas, e é geralmente difícil. Material e Métodos

O trabalho foi realizado nas aulas laboratoriais de Ciências Naturais do 8º ano, na Escola Básica e Secundária do Vale de Ovil. Todas as sementes utilizadas no estudo foram obtidas comercialmente, exceto o milho (*Zea mays*).

Para a realização da atividade, as sementes foram acondicionadas em caixas de Petri, doze no total. Foi colocado algodão húmido em cada uma das caixas, que posteriormente foram fechadas e envolvidas em papel de alumínio. Após a sua identificação com papel autocolante, as caixas foram distribuídas pelos três meios: O frigorífico (2°C), a estufa (37,5°C) e a temperatura ambiente (média de 12,5°C, visto ser variável).

As caixas foram envolvidas em alumínio visto que o fator abiótico em estudo nesta atividade laboratorial era apenas a temperatura e a luz, enquanto um fator igualmente importante na germinação iria afetar os resultados pretendidos.

A preparação da atividade realizou-se no dia 7 de outubro de 2015 mas os resultados começaram apenas a ser registados no dia seguinte, 8 de outubro de 2015. Esta é portanto a data correspondente aos resultados do 1º dia. A recolha de resultados terminou no dia 21 de outubro de 2015, tendo deste modo a atividade decorrido num total de 14 dias.

Resultados e Discussão As sementes de salsa (*Petroselinum crispum*) não se desenvolveram em nenhum dos três meios utilizados no período em que decorreu a atividade. Não apresentaram portanto, nenhuma percentagem de germinação. Tendo em conta que a germinação da espécie *Petroselinum crispum* pode ir de 4 a 6 semanas, o insucesso na germinação pode se justificar principalmente por essa razão. Não foi possível determinar a influência da temperatura na germinação desta espécie. O girassol (*Helianthus annuus*) não se desenvolveu no decorrer da atividade experimental. Em todos os três meios utilizados os resultados foram sempre iguais. Visto que o processo de germinação no girassol é igualmente considerado lento (de 3 a 6 semanas) e a atividade só decorreu durante 2 semanas, este pode ser novamente a causa principal para o insucesso na germinação da espécie. Não foi possível determinar a influência da temperatura na sua germinação. O milho (*Zea mays*) foi a espécie que apresentou mais percentagem de germinação. Sendo esta uma espécie de germinação rápida e com temperatura ideal de 18°C a 35°C, germinou na estufa ao 2º dia e à temperatura ambiente ao 5º dia. No frigorífico não germinou. O facto de a estufa ter sido o meio onde se desenvolveu mais justifica-se essencialmente por esta apresentar as condições mais favoráveis para a germinação desta espécie. O não desenvolvimento da semente do milho no frigorífico justifica-se, por sua vez, pelo facto de este não apresentar as condições ideais para ocorrer o processo de germinação. Por fim, a alface (*Lactuca sativa*) foi a segunda espécie que apresentou maior percentagem de germinação. Sendo uma espécie de germinação rápida e com temperatura ideal de 5°C a 20°C, germinou na temperatura ambiente ao 5º dia e no frigorífico ao 8º dia. Na estufa não germinou. Os resultados obtidos, no caso da estufa, justificam-se por esta apresentar uma temperatura bastante superior à que a alface necessita para germinar. Pelo contrário, no frigorífico, a diferença de temperaturas do frigorífico e do mínimo ideal de germinação da alface era reduzido, sendo que por essa razão a alface acabou por germinar. O meio onde apresentou maior percentagem de germinação foi à temperatura ambiente, que era aquela cuja temperatura média se encontrava mais adequada ao ideal imposto pela espécie *Lactuca sativa*.

Caixas	Frigorífico	Estufa	Temperatura Ambiente
Semente			
Salsa	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou
Girassol	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou
Milho	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Germinou Dia 6 Germinou Dia 7 Germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Germinou Dia 6 Germinou Dia 7 Germinou
Alface	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Não germinou Dia 6 Não germinou Dia 7 Não germinou	Dia 1 Não germinou Dia 2 Não germinou Dia 3 (Fim de semana) Dia 4 (Fim de semana) Dia 5 Germinou Dia 6 Germinou Dia 7 Germinou

Tabela 1 – 1ª semana de resultados



Fig. 1 – Milho dia 9/10 (Estufa)



Fig. 2 – Milho dia 12/10 (Estufa)



Fig. 3 – Milho dia 12/10 (T. Ambiente)

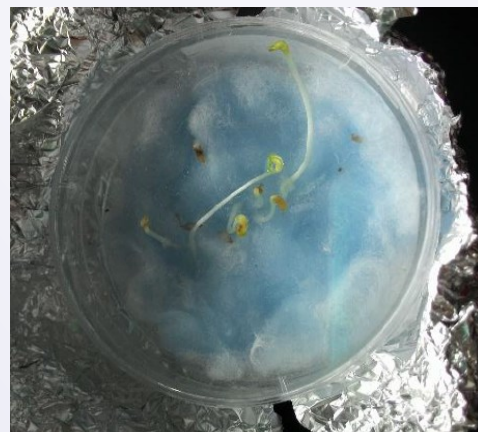


Fig. 4 – Alface dia 12/10 (Estufa)

Tabela 2 – 2ª semana de resultados

Caixas	Frigorífico	Estufa	Temperatura Ambiente
Semente			
Salsa	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou
Girassol	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou
Milho	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Germinou Dia 12 Germinou Dia 13 Germinou Dia 14 Germinou	Dia 8 Germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Germinou Dia 12 Germinou Dia 13 Germinou Dia 14 Germinou
Alface	Dia 8 Germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Germinou Dia 12 Germinou Dia 13 Germinou Dia 14 Germinou	Dia 8 Não germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Não germinou Dia 12 Não germinou Dia 13 Não germinou Dia 14 Não germinou	Dia 8 Germinou Dia 9 (Fim de semana) Dia 10 (Fim de semana) Dia 11 Germinou Dia 12 Germinou Dia 13 Germinou Dia 14 Germinou



Fig. 5 – Alface dia 16/10 (T. Ambiente)

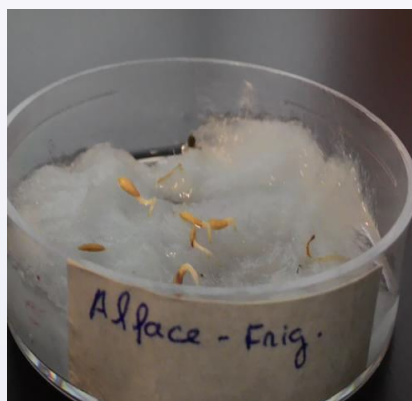


Fig. 6 – Alface dia 16/10 (Frigorífico)

Conclusão

Os fatores abióticos são determinantes no processo de germinação das plantas. A temperatura, particularmente (bem como a luz), destaca-se pela sua enorme importância. Em todas as espécies de germinação rápida testadas, foi possível verificar uma maior percentagem de germinação naquelas que se encontravam nos meios que apresentavam as condições mais ideais para o seu desenvolvimento. A temperatura teve, portanto, um papel importantíssimo na germinação do milho (*Zea mays*) e alface (*Lactuca sativa*).

Bibliografia

CARRAJOLA, C. ;MARTIN, L. e HILÁRIO, T., *Ciências Naturais 8º Ano*, Carnaxide: Projeto Desafios Santillana, 2014.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Milho> (consultado a 12/05/2016)

<http://hortas.info/como-plantar-milho> (consultado a 08/05/2016)

[https://pt.wikipedia.org/wiki/Salsa_\(planta\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Salsa_(planta)) (consultado a 29/04/2016)

https://pt.wikipedia.org/wiki/Lactuca_sativa (consultado a 12/05/2016)

<http://hortas.info/como-plantar-alface> (consultado a 07/05/2016)

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Girassol> (consultado a 20/05/2016)

<http://hortas.info/como-plantar-girassol> (consultado a 12/05/2016)

<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol> (consultado a 12/05/2016)

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE BACTÉRIAS

PESQUISA DE BACTÉRIAS NO AR

Cláudia Costa

Eugénia Pereira

Joaquim Mota

RESUMO

Com o objetivo de pesquisar a existência de bactérias no ar, recorreu-se ao método da monitorização passiva, realizada por sedimentação do ar em caixas de Petri contendo meio de cultura não seletivo, abertas e expostas ao ar em dois espaços fechados diferentes, durante um determinado período de tempo. Os resultados obtidos revelaram não se tratar de culturas de bactérias entéricas. Concluiu-se ainda que o número de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) se encontra dentro dos parâmetros microbiológicos e valores máximos admissíveis a considerar na determinação da qualidade do ar interior definido no Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios

Palavras-chave: ar, bactérias, coloração simples, coloração diferencial de Gram, cultura de microrganismos, meios de cultura, microbiologia, UFC, Kirby-Bauer.

ABSTRACT

In order to search the existence of bacteria in the air, we resorted to the method of passive monitoring which was performed by the air sedimentation in petri dishes containing nonselective culture medium, opened and exposed in the air in two different closed spaces, during a certain period of time. The results revealed not the case of enteric bacteria cultures. We also concluded that the number of CFU (Colony Forming Units) is within the microbiological parameters and maximum allowable values which are considered in the determination of indoor air quality.

INTRODUÇÃO

A ciência da Microbiologia é o estudo dos microrganismos e de suas atividades. Preocupa-se com a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação dos seres microscópicos. Inclui o estudo da sua distribuição natural, das suas relações recíprocas e com outros seres vivos, dos seus efeitos benéficos e prejudiciais sobre os homens e as alterações físicas e químicas que provocam no seu ambiente. Os microrganismos encontram-se em praticamente todos os lugares da natureza. São transportados por correntes aéreas desde a superfície da Terra até às camadas superiores da atmosfera. São encontrados em sedimentos no fundo do mar, a grandes profundidades. Estão na superfície do nosso corpo, no nosso trato digestivo, na boca, no nariz e noutros orifícios naturais. Causam enorme impacto em toda a vida, bem como na constituição física e química do nosso planeta, e são responsáveis pelo transpor-

te dos elementos químicos essenciais à vida, como o carbono, o hidrogénio, o enxofre, o azoto e o oxigénio, além da fotossíntese que alguns são capazes de realizar.

Os tipos e o número de microrganismos do ar variam com o ambiente. Os microrganismos do ar livre são influenciados pelas condições meteorológicas e pela natureza do terreno. A sua sobrevivência no ar depende de diversos fatores, incluindo a intensidade das radiações ultravioleta (e possivelmente de outras radiações microbicidas) da luz solar. Embora possam existir muitos tipos de microrganismos no ar, o seu número não aumenta, uma vez que não há fontes adequadas de nutrientes.

Em recintos fechados, a possibilidade de transmissão de microrganismos patogénicos é muito maior do que ao ar livre, pois estão mais concentrados. Além disso, o ar do interior de espaços fechados pode estar contaminado pelos seus ocupantes, que criam aerossóis infetantes nos atos de espirrar, tossir e falar. A qualidade do ar no interior dos edifícios influencia a saúde dos seus utilizadores, além de ser um fator de conforto. A qualidade do ar interior deve, assim, ser avaliada periódica e sistematicamente, com o objetivo de garantir níveis mínimos de qualidade.

Os contaminantes biológicos incluem microrganismos (bactérias, fungos, vírus), ácaros, pólen, traças, pelo e fezes de animais. A quantidade e o tipo de contaminantes existentes dentro de um espaço fechado estão relacionados com a existência de suspensões orgânicas e minerais no ar; com a temperatura e a humidade relativa; com as condições de manutenção dos sistemas de climatização existentes e com a higiene das instalações bem como número dos seus ocupantes.

Os parâmetros microbiológicos e valores máximos admissíveis a considerar na determinação da qualidade do ar interior (Decreto-Lei 79/2006) encontram-se representados no quadro abaixo.

Existem dois métodos principais para a monitorização dos microrganismos do ar, a **monitorização passiva** (realiza-se por sedimentação do ar em caixas de Petri, contendo meio de cultura não seletivo, abertas e expostas ao ar durante um determinado período de tempo) e a **monitorização ativa** (permite a contabilização direta do número de colónias necessitando para isso de um amostrador de ar, que filtra volumes conhecidos através de um filtro que posteriormente é incubado em meio apropriado). No nosso trabalho utilizamos a monitorização passiva.

	Nº UFC/m ³
Bactérias	500
Fungos	500
<i>Legionella</i>	100

Existem vários **tipos de bactérias**, que podem ser classificadas por dois métodos. O mais simples e mais velho método é pela forma. As quatro principais categorias são: Bactérias em forma de bastonete, conhecidas como **bacilos**. Estas normalmente possuem saliências onduladas, que são os flagelos, utilizadas para se movimentar. Alguns bacilos formam uma parede espessa de células conhecida como esporos que podem sobreviver por longos períodos, mesmo depois da bactéria principal ter sido morta por congelamento, desinfetante ou outros fatores. Quando as condições são propícias, os esporos podem gerar novas bactérias. A febre tifoide, por exemplo, é causada por um bacilo. É o mais numeroso de todos os tipos. Incluem os *cocobacilos* e os *estreptobacilos*; Bactérias esféricas ou elipsoides são conhecidas como **cocos**. Elas surgem isoladamente (micrococos), em cadeias (estreptococos - causa da faringite), em pares (diplococos - causa de um tipo comum de pneumonia) ou em grupos irregulares (estafilococos - causa de muitas infeções de pele). A bactéria do tipo cocos não forma esporos nem se movimenta normalmente; Bactérias espiraladas, conhecidas como **espirilos**. É o tipo menos numeroso. E podem ser designadas de espiroquetas. A bactéria causadora da sífilis é uma espiroqueta; Bactérias em forma de vírgula são chamadas **vibriões** - um exemplo de vibrião é o causador da cólera.

O segundo método de classificação é baseado noutras características, como tamanho, cor e composição química. Uma versão abreviada e simplificada desse sistema é a seguinte: **Ordem Actinomycetales** - bactérias em forma de filamento, por vezes ramificada, que tem crescimento parecido com o do fungo. São importantes na fertilização do

solo e como fonte de antibióticos: **Ordem Beggiatoales** - bactéria em forma de filamento que se move pela superfície num movimento deslizante e gradual. Usam a fotossíntese para produzir alimento. Muitas oxidam compostos de enxofre; **Ordem Chlamydobacteriales** - bactéria envolvida por uma cobertura protetora chamada bainha. Elas crescem em grupos parecidos com algas e usam componentes de ferro para crescer; **Ordem Eubacteriales** - bactéria de célula rígida que tem forma de bastonete ou arredondada. A maioria é imóvel; **Ordem Hyphomicrobiales** - bactéria de célula rígida que se reproduz por germinação; **Ordem Myxibacteriales** - bactéria flexível e em forma de bastonete. Elas excretam limo e algumas produzem apêndices que são visíveis a olho nu; **Ordem Rickettsiales** - bactérias pequenas, em forma de bastonete ou arredondada que são parasitas internos nos humanos e outros animais. A maioria é patogénica; **Ordem Spirochaetales** - bactérias de forma espiral, espiroquetas. A maioria é patogénica.

Uma outra forma de classificar bactérias é avaliar se elas podem viver na presença do ar. Aquelas que sobrevivem são chamadas de **aeróbias** e as que não vivem no ar são as anaeróbias. Algumas podem viver com ou sem ar e são chamadas **anaeróbios facultativos**. O Tétano é um exemplo de doença causada por uma bactéria anaeróbia, normalmente encontrada no solo. Elas não representam riscos para os seres humanos, a menos que entrem no corpo através de um ferimento, particularmente um ferimento profundo (feito ao pisar em um prego, por exemplo).

O estudo microscópico das características morfológicas (dimensão, forma e tipo de associação) e das características de coloração é, geralmente, insuficiente para a obtenção de uma identificação satisfatória do agente patogénico. Assim, para conhecer as propriedades, fisiológicas e bioquímicas é necessário cultivar as células microbianas no laboratório. A cultura de microrganismos consiste no crescimento de populações microbianas em meios de cultura laboratoriais. Uma cultura que tem apenas um tipo de microrganismo é conhecida por cultura pura, uma cultura que tem mais do que um tipo de microrganismo é uma cultura mista. A cultura de microrganismos consiste num passo rotineiro do exame microbiológico, sendo feito simultaneamente com o exame microscópico ou imediatamente depois.

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. A finalidade de um meio de cultura é fornecer nutrientes para o cultivo de microrganismos. Com o desenvolvimento de bactérias, é possível identificá-las através do uso de meios de cultura seletivos.

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*, *Salmonela & Shigela*.
- **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.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. **Recolha de Amostras:** Foram recolhidas duas amostras: **local A** – Bancada de trabalho do laboratório; **local B** – bancada de trabalho da sala de preparação. O método utilizado foi a monitorização passiva por sedimentação do ar. As amostras foram recolhidas em duas placas de Petri contendo um meio nutritivo NA (*Nutrient Agar*).



Figura 1 - Recolha de amostras

2. **Cultura e isolamento dos microrganismos obtidos** - As placas foram colocadas a uma temperatura constante de 37°C, em estufa, durante 48 horas. A partir de uma UFC formada procedeu-se à obtenção de culturas puras através do método do riscado em placa, em meio *MacConkey*.

3. **Caracterização dos microrganismos que proliferaram nas culturas:**

Caracterização das colónias - observação à lupa das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) fazendo a sua caracterização quanto às suas características morfológicas.

4. **Realização de uma coloração simples, não diferencial, com azul-de-metileno** que permite uma coloração uniforme das bactérias e a sua observação ao microscópio ótico.

5. **Realização de uma coloração diferencial de GRAM** que permitir distinguir as bactérias GRAM + e GRAM -. A capacidade das células reterem ou perderem o corante *violeta de cristal* 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.

6. **Constatação da atividade das enzimas catalase e citocromo oxidase**

6.1. **Atividade da enzima catálase** – Aplicou-se uma gota do reagente peróxido de hidrogénio ($2H_2O$) a 10%, numa das colónias obtidas colocada, previamente, sobre uma lâmina de vidro.

6.2. **Atividade da enzima citocromo oxidase** – Colocou-se uma colónia de bactérias. em papel de filtro e adicionaram-se três gotas de reagente de *Kovacs (tetrametil-p- fenilenediamina dibidrocloreto 1%)*.

7. **Teste de suscetibilidade aos antibióticos** - aplicou-se a técnica de Kirby-Bauer - sementeira de uma cultura bacteriana no meio de cultura Mueller-Hinton (sólido), após a qual se colocam discos de papel impregnados com os seguintes antibióticos: Ampicilina (10µg), Vancomicina (5µg) e Cotrimoxazole (25µg).

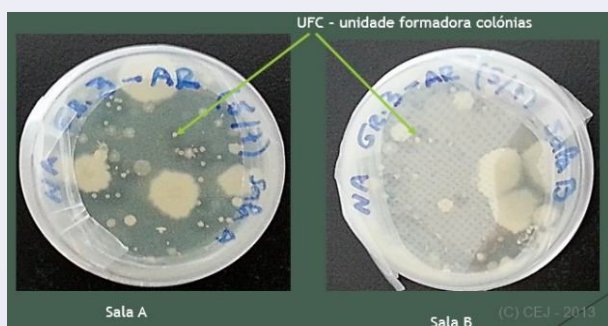


Figura 2 - UFC obtidas após 48 horas na estufa

R E -

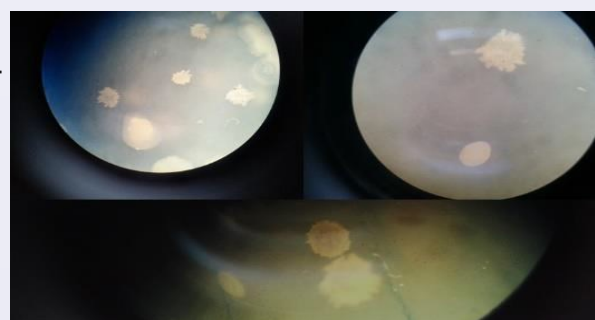


Figura 3 - Observação à lupa binocular numa ampliação de 20x30, não considerando o zoom da máquina.

	CARACTERÍSTICAS DAS COLÓNIAS ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS					
	A			B		
Forma	Filamentosa	Circular	Irregular	Lenticular	Filamentosa	Circular
Elevação	Elevada	Achatada	Umbiculada	Achatada	Elevada	Achatada
Margem	Lobulada	Inteira	Inteira	Inteira	Lobulada	Inteira

Figura 4 - Caracterização das bactérias encontradas nas amostras.

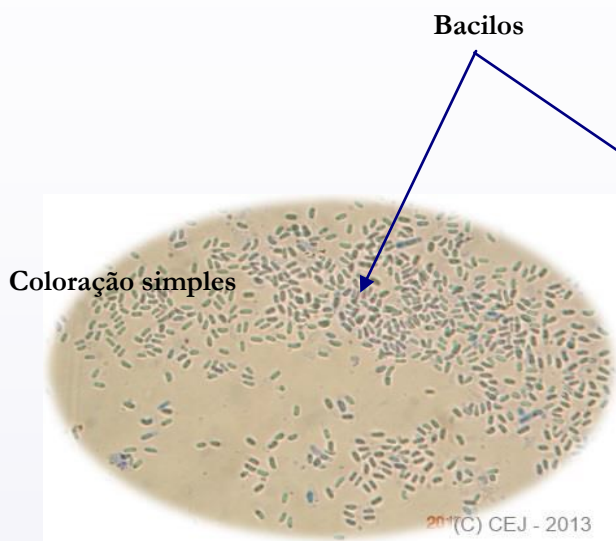


Figura 5 - Observação ao MOC ampliado 1000x, não considerando o zoom da máquina.

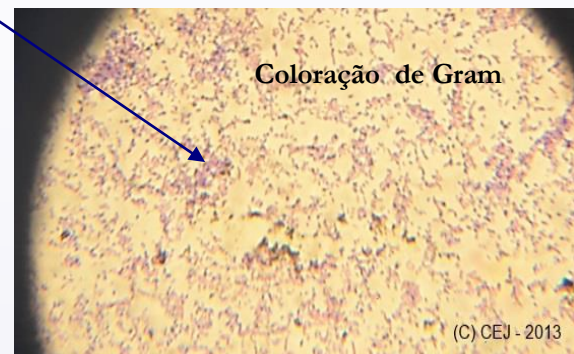


Figura 6 - Observação ao MOC ampliado 1000x, não considerando o zoom da máquina.



Figura 7 - Constatação da atividade das enzimas catalase e citocromo oxidase.

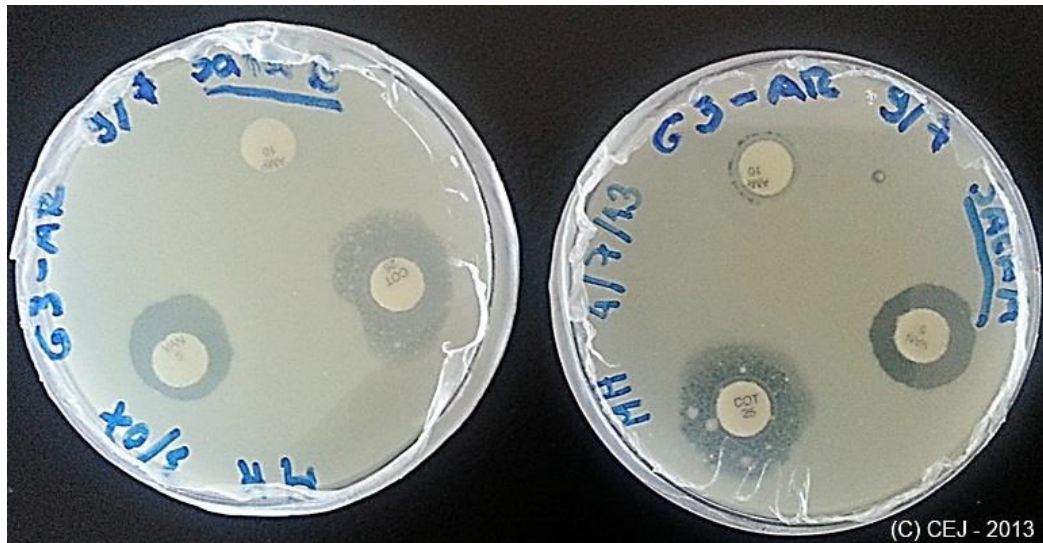


Figura 8 - Teste de susceptibilidade a antibióticos com a técnica de Kirby-Baner. A – Ampicilina (10µg), V - Vancomicina (5µg) e C - Cotrimoxazole (25µg).

DISCUSSÃO

Após a incubação durante, aproximadamente 48 horas, procedeu-se à contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC).

Fórmula utilizada nos cálculos:
$$n^{\circ}UFCm3/ = \frac{n^{\circ} \text{ de UFC por caixa}}{\text{Área da caixa (m}^2\text{)}} * \frac{1}{23}$$

Os resultados obtidos (1396 UFC e 1662 UFC nas salas A e B, respetivamente) podem parecer bastante elevados quando comparados com os parâmetros microbiológicos e valores máximos admissíveis a considerar na determinação da qualidade do ar interior segundo o decreto-lei 79/2006. A legislação prevê um máximo de 500 UFC de bactérias e 500 UFC de fungos. Mas, como o meio utilizado foi o NA (Agar nutrientes) que, por se tratar de um meio não seletivo, permite a proliferação de bactérias e fungos, os resultados poderão tratar-se de uma mescla destes dois tipos de organismos pelo que os consideramos aceitáveis acrescentando ainda o facto da recolha das amostras ter sido efetuada em locais de manuseamento deste tipo de organismos.

Ao fazer-se o isolamento de uma colónia em meio MaC (Agar *MacConkey*), pelo método do riscado, os resultados foram nulos dando-nos a informação que não se tratam de organismos entéricos uma vez que o meio nutritivo utilizado é seletivo para este tipo de organismos, inibindo o crescimento de organismos não entéricos.

Após a coloração simples, com o corante básico azul-de-metileno, e observando ao Microscópio Ótico Composto (MOC) constata-se que os organismos da colónia selecionada têm a forma de bacilos.

Quando se colora a colónia utilizando o método de Gram (coloração diferencial) conclui-se tratarem-se de organismos Gram - (Gram negativos) pois não retiveram o violeta cristal e foram corados pela safranina, apresentando coloração avermelhada. Neste tipo de bactérias o peptidoglicano é o principal constituinte das suas paredes celulares que, sendo menos espesso que nas bactérias Gram positivas (Gram +), permite a passagem do corante safranina. O etanol remove os lípidos da membrana externa da parede celular aumentando a sua permeabilidade pelo que o complexo violeta-cristal-iodo pode ser extraído e assim serem coradas pela safranina. Uma observação mais atenta permitiu-nos ainda

constatar a presença de alguns Cocos que apresentavam coloração violeta (Gram+) o que reforça a ideia de se tratar de uma mescla de organismos.

As colónias das placas A e B reagiram positivamente ao peróxido de hidrogénio, apresentando efervescência, resultante da libertação de oxigénio decorrente da atividade da enzima catalase, o que revela a presença desta enzima. Assim se conclui tratar-se de organismos aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Ao reagirem negativamente ao reagente de *Kovacs* (ausência de coloração) constata-se a ausência da enzima citocromo-oxidase. Esta enzima intervém na cadeia transportadora de eletrões, na respiração celular, e a sua atividade é identificada pela aplicação daquele reagente (tetrametil-p- fenilenediamina dihidroclorato 1%) em papel de filtro, onde é colocada uma colónia de bactérias. A existência desta enzima é evidenciada pelo aparecimento de uma cor azul-roxo num período de cerca de 10 segundos.

Para o teste de sensibilidade aos antibióticos foi utilizado o método de difusão, nomeadamente a técnica de *Kirby-Bauer*, consistindo na sementeira de colónias num meio de cultura *Mueller-Hinton* (MH) sólido, seguida da aplicação de discos de papel impregnados com antibióticos cujas concentrações são conhecidas. A ausência de halos de inibição nos discos impregnados de *Ampicilina*, revela a resistência das bactérias selecionadas a este antibiótico na concentração selecionada. No entanto revelaram sensibilidade aos antibióticos *Vancomicina* e *Cotrimoxazole* por apresentarem halos de inibição aos discos.

Um estudo mais aprofundado, que permitiria identificar as bactérias de modo mais preciso, implicaria a utilização de outros meios de cultura seletivos e a sequenciação de DNA.

BIBLIOGRAFIA

BROOKS, GEO F. et al. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

Como tudo funciona - <http://saude.hsw.uol.com.br/bacteria1.htm>. Consultado em 16.07.2013

GOMES, M., Projecto no ensino da (micro)biologia - um guia do professor com sugestões de actividades em microbiologia – Casa das Ciências, 2012 .

Microbiologia Médica - <http://pt.scribd.com/doc/89139732/micro-p-> Consultado em 16.07.2013

PELCKAR,M. et al, Microbiologia-Volume I, Editora Macgraw-Hill Ltd, S. Paulo, 1980.

Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios - Decreto-Lei n.º 79/2006 de 4 de Abril. <http://dre.pt/pdf1s/2006/04/067A00/24162468.pdf>. Consultado em 16.07.2013

Pesquisa de microrganismos presentes na mão

Isabel Maria Pinto Ribeiro Carvalho
Maria de Lurdes Coelho Monteiro
Paula Cristina Silva Lima

Resumo

Os microrganismos presentes nas mãos

As mãos estão permanentemente em contacto com outras superfícies pelo que tendencialmente há uma enorme transferência de microrganismos de e para as mãos. Deste modo reveste-se de uma grande importância a pesquisa e caracterização dos microrganismos que se possam alojar na referida superfície. Esse estudo é possível graças à aplicação de uma grande diversidade de técnicas de microbiologia de maior ou menor facilidade de aplicação. A recolha de uma amostra da palma da mão e de outra do dedo anelar permitiu fazer recurso das várias técnicas de microbiologia, nomeadamente a inoculação de vários meios de cultura com as duas amostras em estudo, a obtenção de suspensão, o estudo da sensibilidade a antibióticos. Foram obtidas 3 UFC na amostra do dedo anelar, de acordo com os critérios do Instituto Dr. Ricardo Jorge. Em relação à palma da mão foram contabilizadas pelo menos 74 UFC, valor muito exorbitante quando comparado com os Critérios do Instituto Dr. Ricardo Jorge que apresentam como referência o valor a 5 UFC/dedo (25 UFC/mão). Este resultado inesperado foi consequência do facto de se ter passado por diversas vezes a palma da mão pelo tampo da bancada de trabalho, embora a mesma tenha sido previamente desinfetada com álcool a 95%. Estes resultados implicam uma constatação direta – a necessidade imperiosa de efetuar uma higienização frequente das mãos, pois se muitos microrganismos são inócuos (não patogénicos), outros há que assumem particular virulência.

Palavras-Chave: Microbiologia, microrganismos, bactérias, fungos, técnicas microbiológicas

Abstract

Microorganisms present on the hands

Our hands are always in contact with different surfaces, so there is a tendency to exchange large amounts of microorganisms between our hands and the surroundings. Thus, it is of great importance the research and characterization of microorganisms that can hand in that surface. This study is possible by the application of a wide variety of microbiological techniques with greater or lesser ease of application. The gathering of a palm sample and other from the ring finger has allowed the use of various microbiological techniques, including inoculation of different culture media with the two samples in study, the obtainment of the suspension, the study of antibiotic sensitivity. 3 CFU were obtained from the ring finger sample, according to the criteria of the Institute Dr. Richard George. Regarding the palm, there was a recording of at least 74 CFU, an exorbitant value compared to the criteria of the Institute Dr. Richard George, showing reference value at 5 CFU / finger (25 CFU / hand). This unexpected result was due to the fact that we put our palms over the workbench top for several times, although it was previously disinfected with 95% alcohol. These results imply a

direct observation - the urgent need to make a frequent hand hygiene, because if many microorganisms are harmless (nonpathogenic), there are others that are of particular virulence.

Keywords: Microbiology, microorganisms, bacteria, fungi, microbiological techniques.

Objetivo

- . Pesquisar microrganismos existentes nas mãos
- . Identificar os diferentes grupos de microrganismos

Introdução

A Microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, ou seja, os seres vivos de dimensões microscópicas que existem como células únicas ou como grupos de células. O seu nome tem origem em três vocábulos gregos, mikros (pequeno), bios (vida) e logos (ciência). Os objetos de estudo da Microbiologia são as bactérias, os fungos, os protozoários e as microalgas; também estão incluídos os vírus assim como os viroides e os príões, ainda que não apresentem estrutura celular. O objetivo do microbiólogo é entender o modo como os microrganismos funcionam e, com base nesta compreensão, encontrar formas de explorar os aspetos benéficos da sua atividade e evitar os seus aspetos negativos.

Ainda que invisíveis, de uma forma ou de outra, os microrganismos influenciam as nossas vidas e por isso a Microbiologia é uma Ciência Biológica da maior importância. Como uma Ciência Biológica, a Microbiologia, os Microbiólogos e os microrganismos estiveram envolvidos em estudos pioneiros que elucidaram mecanismos moleculares cruciais em Biologia. No entanto, a verdade é que a maioria das pessoas só se apercebe da sua existência quando tem uma doença provocada por um desses microrganismos. Ainda assim, mesmo ignorando isso, em cada segundo das vidas são afetadas (e não só negativamente) pelo resultado da atividade microbiana. De facto, são eles que reciclam a biomassa morta, que são a base das cadeias alimentares, que contribuem decisivamente para a composição da atmosfera. Ou seja, são eles que fazem a diferença entre um planeta vivo como o conhecemos e um planeta morto!

Nos habitats naturais, os microrganismos crescem frequentemente em populações mistas mais ou menos complexas, que incluem várias espécies microbianas. Contudo, para estudar um dado microrganismo, é necessário obter uma população de células desse microrganismo em cultura pura ou axénica. Assim, o isolamento de um determinado microrganismo a partir de populações mistas, a manutenção e conservação de culturas puras e o crescimento de populações microbianas puras em meios de cultura laboratoriais são técnicas básicas e essenciais em microbiologia.

Os microrganismos são ubíquos, isto é, estão presentes em todo o lado. Por isso, para obter e manter uma cultura pura é essencial evitar que outros microrganismos (contaminantes) entrem em contacto com ela. Assim, com o objetivo de evitar a ocorrência de contaminações, o microbiólogo recorre a técnicas de assepsia e à esterilização e desinfecção dos materiais que usa no manuseamento das culturas puras de microrganismos. Estas técnicas são críticas no controlo e prevenção do desenvolvimento de microrganismos, quer seja no laboratório quer em processos industriais, nomeadamente nas indústrias alimentar e farmacêutica, ou na prevenção de doenças infecciosas.

O estudo dos microrganismos está muitas vezes dependente da possibilidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras. As necessidades nutricionais específicas dos microrganismos variam de espécie para espécie, sendo possível distinguir vários grupos nutricionais de microrganismos. Com o conhecimento dos nutrientes necessários ao crescimento dos microrganismos, é possível a formulação de meios de cultura que promovam o crescimento de um determinado grupo de microrganismos no laboratório.

Os meios de cultura (preparações sólidas, líquidas ou semissólidas que contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos) são utilizados com a finalidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras. Os meios de cultura devem ter na sua composição, os nutrientes indispensáveis ao crescimento do organismo em questão, sob forma assimilável e em concentração não inibitória do crescimento. Além disso, após a sua preparação, cada meio de cultura deve ser submetido a esterilização, por forma a eliminar qualquer organismo vivo contaminante. Por outro lado, para manter uma cultura pura, é necessário que o meio de cultura que se pretende utilizar seja mantido desprovido de qualquer organismo vivo contaminante. Para a prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas puras recorre-se a técnicas de assepsia.

De um ponto de vista geral, os meios de cultura podem ser classificados tendo em conta o seu estado físico, a sua composição química e os objetivos funcionais a que se destinam. A especificidade dos meios de cultura é muito importante, nomeadamente no isolamento e identificação de certos microrganismos (por exemplo, no isolamento de microrganismos do solo) ou em testes de sensibilidade a antibióticos ou na análise microbiológica de águas, de alimentos, etc.

A cultura pura de um dado microrganismo é uma cultura de células genética e morfologicamente idênticas. A imobilização das células num meio sólido torna possível a visualização do crescimento em massas celulares isoladas denominadas colónias. As colónias microbianas são caracterizadas por uma forma e tamanho que depende do próprio organismo, de condições ambientais como sejam: a quantidade de oxigénio e de nutrientes disponíveis no meio de cultura e de outros parâmetros fisiológicos.

Para obter uma cultura pura podem ser usadas várias técnicas como a do riscado em placa ou método das diluições sucessivas. Ambos os métodos pretendem o isolamento de uma população bacteriana a partir de uma única célula inicial ou seja, permitem o isolamento e obtenção de culturas puras através do isolamento de colónias. 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.

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.

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 as bactérias Gram-negativas, que não retêm o corante violeta cristal e são coradas pela safranina apresentam coloração vermelha. 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.

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.

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. 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. O teste à citocromo-oxidase (Teste da oxidase) é baseado na presença de uma enzima oxidase intracelular. 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.

A amostragem e a análise das superfícies permitem determinar se os métodos de limpeza e desinfeção utilizados são eficazes. Para a determinação de bactérias aeróbias mesófilas totais podem-se utilizar diferentes métodos: o das placas de contacto, o método de “lavagem”, e o método da zaragatoa. Estes métodos não permitem um estudo da carga biológica porque apenas recolhem uma pequena proporção de microrganismos presentes. Contudo permitem avaliar a qualidade de higiene de superfícies como chão, mesas, alguns equipamentos, roupas e mãos. O método da zaragatoa é o mais antigo e o mais utilizado para fazer o exame microbiológico de superfícies. Embora não existam padrões estabelecidos, para mãos limpas o limite aceitável é até 5 UFC/dedo. (Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge).

Materiais e métodos

• Preparação e distribuição do meio de cultura Slanetz/Bartley (SB)

Material utilizado

- | | | |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| ◆ Caixas de petri esterilizadas | ◆ Papel absorvente | ◆ Marcador |
| ◆Lamparina | ◆ Placa de aquecimento | ◆ Esguicho com água destilada |
| ◆ Fósforos | ◆ Balança eletrónica | ◆ ágar |
| ◆ Burrifador com álcool | ◆ Frigorífico | ◆ Meio de cultura SB |
| ◆ Proveta | ◆ Espátulas | |
| | ◆ Papel de estanho | |

Procedimento

- 1º. Burrifar a bancada com álcool e limpar com papel absorvente.
- 2º. Acender a lamparina e mantê-la o mais próximo possível do local de manipulação do material.
- 3º. Medir, com o auxílio de uma proveta, 125 ml de água destilada.
- 4º. Pesar no papel de estanho a massa adequada do meio de cultura e do ágar.
- 5º. Transferir o meio de cultura, o ágar e a água destilada para o frasco de cultura
- 6º. Aquecer, na placa elétrica, o frasco de cultura até obter uma solução límpida.
- 7º. Deixar arrefecer até atingir uma temperatura que permita o seu manuseamento..
- 8º. Verter o meio de cultura para as caixas de petri, fazendo uma camada de aproximadamente 5 mm.
- 9º. Deixar solidificar.
- 10º. Registrar na base de cada caixa de petri o nome do meio de cultura, a data da elaboração e o número do grupo.
- 11º. Inverter e reservar as caixas de petri no frigorífico devidamente acondicionadas.

Nota: Cada grupo elaborou um meio de cultura diferente, o qual foi partilhado posteriormente. Daí só termos feito referência ao meio que elaboramos.

Recolha de amostra das superfícies: mão e dedo

Material utilizado

- ◆ Duas caixas de petri com meio de cultura Na (nutrientes agar)
- ◆ Duas zaragatoas
- ◆ Soro fisiológico ou água destilada
- ◆ Lamparina
- ◆ Fósforos
- ◆ Parafilme
- ◆ Burrifador com álcool
- ◆ Papel absorvente
- ◆ Régua
- ◆ Marcado

Procedimento

1. Burrifar a bancada com álcool e limpar com papel absorvente.
2. Acender a lamparina e mantê-la o mais próximo possível do local de manipulação do material.
3. Identificar duas caixas de petri contendo meio NA com o número do grupo, a data e local da realização da colheita.
4. Humedecer com soro fisiológico ou água destilada a superfície a partir da qual se pretende recolher a amostra.
5. Passar a zaragatoa estéril em toda a superfície em estudo.
6. Abrir parcialmente a parte superior das caixas de petri, junto à chama da lamparina, e inocular, fazendo um riscado, cada caixa de petri com a respetiva amostra.
7. Fechar hermeticamente cada caixa de petri com o parafilme.
8. Colocar as caixas de petri na estufa a 37°C durante 3 a 4 dias.

• Contagem e caracterização das bactérias presentes na mão e dedo

Material utilizado

- ◆ Microscópio Ótico Composto (M.O.C.)
- ◆ Lâminas e lamelas
- ◆ Lupa binocular
- ◆ Óleo de imersão
- ◆ Caixas de petri com as amostras pesquisadas
- ◆ Soro fisiológico ou água destilada
- ◆ Lamparina
- ◆ Fósforos
- ◆ Burrifador com álcool
- ◆ Papel absorvente
- ◆ Régua
- ◆ Marcador
- ◆ Corante azul de metileno
- ◆ Ansa
- ◆ palito
- ◆ Pinça
- ◆ Pipetas de pasteur estéril
- ◆ Violeta de cristal
- ◆ Solução de lugol (mordente)
- ◆ Etanol a 95%
- ◆ Papel de filtro
- ◆ Peróxido de hidrogénio a 10%
- ◆ Reagente de Kovacs

Procedimento

I. Contagem e caracterização morfológica

1. Burrifar a bancada com álcool e limpar com papel absorvente.
2. Acender a lamparina e mantê-la o mais próximo possível do local de manipulação do material.
3. Com o auxílio de um marcador, proceder à contagem das colónias na base da caixa de petri.
4. Determinar a dimensão das colónias.
5. Observar à lupa as caixas de petri para caracterizar as colónias quanto à forma, elevação e margem.

II. Coloração simples

1. Selecionar uma das colónias mais isolada para proceder às restantes técnicas de caracterização.
2. Colocar uma gota de água destilada esterilizada no centro da lâmina.
3. Abrir parcialmente a parte superior das caixas de petri, junto à chama da lamparina, e usando a ansa, previamente esterilizada, retirar uma amostra da colónia em estudo.
4. Realizar um esfregão com o material recolhido e colocar a lamela sobre o mesmo.
5. Colocar, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, uma gota de azul de metileno num dos bordos da lamela e absorver, com papel de filtro, o meio de montagem a partir do outro bordo da lamela.
6. Observar ao M.O.C.

III. Coloração de Gram

1. Colocar uma gota de água destilada esterilizada no centro de outra lâmina.
2. Abrir parcialmente a parte superior das caixas de petri, junto à chama da lamparina, e usando a ansa, previamente esterilizada, retirar uma amostra da colónia em estudo.
3. Realizar um esfregão com o material recolhido.
4. Proceder à fixação do esfregão, passando rapidamente a lâmina sobre a chama da lamparina até que o meio de montagem evapore completamente.
5. Verter sobre o esfregão 2 ou 3 gotas de violeta de cristal, tendo o cuidado de agitar suavemente durante cerca de um minuto.
6. Remover o excesso de corante com água corrente.
7. Colocar 2 ou 3 gotas de solução de lugol (mordente) sobre o esfregão. Deixar atuar durante um minuto .
8. Lavar novamente com água corrente.
9. Secar a preparação agitando ao ar ou utilizando cuidadosamente papel absorvente.
10. Verter 2 ou 3 gotas de etanol a 95% sobre o esfregão. Agitar suavemente durante 1 minuto.
11. Colocar 2 ou 3 gotas de safranina sobre o esfregão. Deixar atuar durante 30 segundos.
12. Remover o excesso de corante com água corrente. Secar a preparação com papel absorvente.
13. Observar ao M.O.C.

IV. Pesquisa da catalase e da citocromo oxidase

1. Abrir parcialmente a parte superior da caixa de petri, junto à chama da lamparina, e usando um palito, retirar uma

amostra da colónia em estudo.

2. Colocar o material recolhido no centro de uma lâmina
3. Adicionar 1 gota de peróxido de hidrogénio a 10%.
4. Colocar 2 ou 3 gotas de reagente Kovacs num papel de filtro.
5. Voltar a abrir parcialmente a parte superior da caixa de petri, junto à chama da lamparina, e usando um palito, retirar nova amostra da colónia em estudo.
6. Passar o palito contendo o material biológico sobre o papel de filtro molhado.

• Teste da sensibilidade a antibióticos

Material utilizado

- ◆ Caixa de petri com meio de cultura Na e amostra de mão
- ◆ Ansa
- ◆ Meio Mueller-Hinton líquido
- ◆ Tubo cónico volumétrico
- ◆ Discos de antibióticos
- ◆ 3 Caixas de petri com meio Mueller-Hinton sólido
- ◆ Lamparina
- ◆ Fósforos
- ◆ pinça
- ◆ Pipetas de pasteur estéreis
- ◆ Burrifador com álcool
- ◆ Papel absorvente
- ◆ Régua
- ◆ Marcado

Procedimento

1. Burrifar a bancada com álcool e limpar com papel absorvente.
2. Acender a lamparina e mantê-la o mais próximo possível do local de manipulação do material.
3. Com uma pipeta de pasteur transferir cerca de 2 ml de meio Mueller-Hinton líquido para o tubo cónico.
4. Retirar uma ansada de uma das colónias mais individualizadas e suspender no tubo cónico.
5. Agitar bem durante 2 a 3 horas, mantendo a suspensão a cerca de 37°C (**nota: como estava muito calor ficou à temperatura ambiente**)
6. Após se verificar a turvação da suspensão, com o auxílio de uma pipeta de pasteur inocular as 3 Caixas de petri com meio Mueller-Hinton sólido. Verificar se a suspensão cubriu completamente a superfície do meio de cultura de todas as placas de petri.
7. Remover, com o auxílio da pipeta de pasteur, o excesso da suspensão.
8. Colocar, com o auxílio da pinça, um disco de antibiótico no centro de cada caixa de petri.
9. Inverter e marcar na base da caixa de petri a amostra em estudo, a data e o número do grupo de trabalho.
10. Fechar hermeticamente cada caixa de petri com o parafilme.
11. Incubar à temperatura de 37°C durante 24 horas.

Resultados

Contagem e caracterização morfológica das colônias					
Meio	Proveniência	Número de colônias	Caracterização das colônias	Registro fotográfico	Comparação com valores standard (Critérios do Instituto Dr. Ricardo Jorge S a 5 UFC/dedo)
NA	dedo	3 colônias encontradas	<p>colônia com 3 mm de ϕ, cor rosada, forma circular, margem inteira, elevada, textura lisa, brilho mate, opaca e consistência viscosa.</p> <p>colônia com 3 mm de ϕ, cor branca, forma lenticular, margem lobulada, convexa, textura rugosa, brilho mate, opaca e consistência viscosa.</p> <p>colônia com 1,5 mm de ϕ, cor branca, forma irregular, margem lobulada, convexa, textura lisa, brilho mate, opaca e consistência granulosa.;</p>		De acordo com os valores standard
	Palma da mão	66 colônias individualizadas e 8 resultante da fusão de várias individualizadas	A generalidade das colônias apresenta 1,5 mm de ϕ , cor branca, forma circular, margem inteira, achatada, textura lisa, brilho mate, transparente e consistência viscosa.		Em desacordo com os valores standard
MAC	Riscado realizado com bactérias do meio NA relativas à palma da mão	Ausência de colônias			As colônias encontradas não pertenciam aos enterococos

Tabela 1


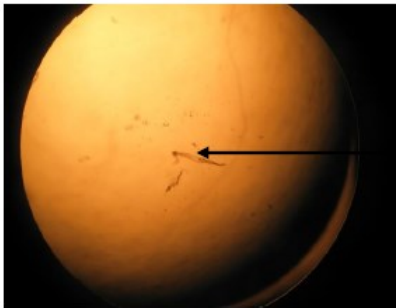
Estudo das bactérias pela técnica da coloração			
Técnica utilizada	Corantes utilizados	Registro fotográfico	Resultados obtidos
Coloração simples por irigação	Azul de metileno		1- Não foram observadas bactérias. A estrutura observada assemelha-se a uma hifa de fungo e não corou de azul.
Coloração de Gram	Violeta cristal Safranina		2- Ausência de qualquer coloração. As estruturas observadas assemelham-se a fragmentos de hifas de fungos.

Tabela 2

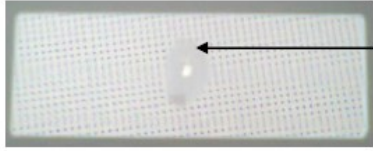
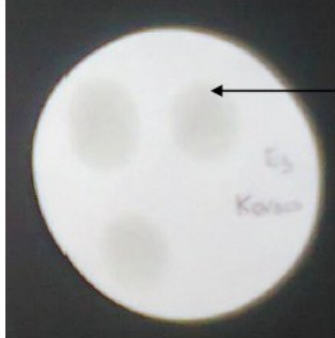
Pesquisa da ação da catalase e da citocromo oxidase			
Material biológico utilizado	Substância utilizada	Registo fotográfico	Resultados obtidos
Amostra de colónia individualizada retirada do meio NA relativa à superfície dedo	Peróxido de hidrogénio a 10%		1- Pequena reação de efervescência
Amostra de colónia individualizada retirada do meio NA relativa à superfície dedo	Reagente de Kovacs		2- Ausência de qualquer coloração indicadora da ocorrência de reação

Tabela 3

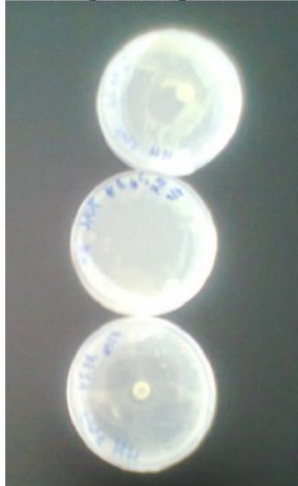
Resultados do teste da sensibilidade a antibióticos			
Antibiótico	Concentração (µg)	Diâmetro em mm do halo	Registo fotográfico
Vancomicina	5	12	
Ampicilina	10	6	
Cotrimoxazole	25	10	

Tabela 4

Discussão

Após inoculação da palma da mão e dedo em diferentes meios de cultura: meio Agar nutriente (Na) e meio Agar MacConkey (Mac), regista-se o número de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) em cada caixa e compara-se o resultado obtido com a legislação (dados do Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge).

O meio Agar nutriente (Na) é designado de meio de cultura geral, visto ser adequado ao crescimento e manutenção de vários microrganismos, é um meio económico para o cultivo de microrganismos pouco exigentes em nutrientes. A composição deste meio inclui extrato de levedura ou de carne, peptona e cloreto de sódio como componentes nutritivos, e o agar que permite ao meio obter uma consistência sólida, de forma a proporcionar um suporte ao desenvolvimento das colónias de microrganismos. Visto ser um meio pouco seletivo e exigente podem desenvolver-se vários grupos de bactérias e até mesmo fungos e como se pode ver pela tabela registaram-se neste meio várias UFC. No meio Na onde foi inoculado amostra do dedo foram registadas 3 UFC enquanto no meio com inóculo da palma da mão contaram-se 66 UFC individualizadas e 8 resultantes da fusão de várias individualizadas, portanto mais de 66 UFC. Embora não existam padrões estabelecidos, para mãos limpas o limite aceitável, segundo o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge é até 5 UFC/dedo e para a palma da mão é aceitável até 25 UFC. O resultado obtido para o dedo encontra-se dentro dos limites considerados aceitáveis para mãos limpas enquanto o registado para a palma da mão é muito superior ao aceitável, uma vez que as mãos não estavam limpas, consequência do facto de se ter passado por diversas vezes a palma da mão pelo tampo da bancada de trabalho, embora a mesma tenha sido previamente desinfetada com álcool a 95%.

O meio Agar MacConkey (Mac) é um meio seletivo e diferencial. Seletivo pois contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias não entéricas e 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. As bactérias incapazes de fermentar a lactose formam colónias de cor brancas/amareladas (não-coliformes). No meio Mac onde foi inoculado amostra da mão não se obtiveram colónias o que pressupõe a não existência de enterobactérias uma vez que este meio inibe o crescimento de bactérias não entéricas.

Sendo a observação de bactérias em preparações não coradas difícil recorre-se a corantes. Estes permitem aumentar o contraste entre as células e o meio a observar e estruturas particulares, como o invólucro celular, o material genético e outros constituintes citoplasmáticos.

Na coloração simples aplicou-se um único corante (azul de metileno) sobre o esfregaço durante um tempo específico para as células corarem de um modo uniforme. Aquando da observação microscópica da preparação obtida por coloração simples, não se observaram quaisquer tipos de bactérias mas apenas fungos, tal como se pode ver pelas imagens da tabela 1. 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 organismos que reagem de modo diferente ao mesmo corante. As bactérias Gram-positivas, retêm o corante violeta cristal e apresentam coloração violeta enquanto as bactérias Gram-negativas, que não retêm o corante violeta cristal 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. Durante a observação microscópica da preparação obtida por coloração de Gram, tal como na coloração simples, não se observaram bactérias, como se pode constatar na tabela 2.

Os microrganismos apresentam várias respostas à presença de oxigénio: os aeróbios obrigatórios, os anaeróbios

obrigatórios, os anaeróbios facultativos, os anaeróbios aerotolerantes, e os microaéerofilos. 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. 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. A pesquisa da catalase é indispensável na identificação de cocos gram positivos. Os estafilococos são catalase positivos, enquanto que os estreptococos são catalase negativos. O teste da oxidase é utilizado para verificar a presença ou a ausência da enzima citocromo oxidase. A pesquisa da oxidase utiliza-se para diferenciar o género *Neisseria* (oxidase positiva) de outros cocos gram negativos e para distinguir a família *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa), de outros bacilos gram negativos (oxidase positiva). O teste da catalase deu positivo como se pode comprovar na tabela o que é indicador de cocos gram positivos enquanto o teste da oxidase deu negativo o que permite identificar a possibilidade da família das enterobactérias, conforme tabela 3.

Para avaliar *in vitro* a suscetibilidade bacteriana neste trabalho utiliza-se o Método de Difusão, nomeadamente a técnica de Kirby-Bauer. Esta 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 sensível (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).

Assim, a partir do dados da tabela, relativamente à sensibilidade aos antibióticos Ampicilina (6mm de halo) pode-se deduzir que as *Enterobacteriaceae* (<14mm) e as *Enterococcus* spp. (<8mm) são resistentes à Ampicilina, (ver tabela 4).

Na pesquisa bibliográfica não foi possível encontrar referência aos antibióticos Vancomicina e Cotrimoxazole, nomeadamente em relação a valores standard para considerar se as bactérias apresentam sensibilidade ou resistência aos mesmos e a partir de que dosagem. Deste modo não nos foi possível obter conclusões fiáveis.

Conclusão

Os resultados obtidos a partir do inóculo da palma da mão implicam uma constatação direta – a necessidade imperiosa de efetuar uma higienização frequente das mãos, pois se muitos microrganismos são inócuos (não patogénicos), outros há que assumem particular virulência.

Atualmente, e devido ao aumento de resistência microbiana ao uso de antibióticos o conhecimento da suscetibilidade dos microrganismos aos antibióticos também deve ser um fator a considerar (tal como constatado no teste da sensibilidade aos antibióticos). 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.

As técnicas microbiológicas utilizadas não permitiram a identificação das bactérias, uma vez que na observação microscópica com coloração apenas foram observados fungos. Para a identificação das bactérias mais meios de cultura teriam que ser usados e posteriormente teria que se sequenciar o DNA, pois a identificação é presuntiva.

Bibliografia

E-escola – Instituto Superior Técnico - <http://e-escola.ist.utl.pt/ftema.asp?canal=biologia&id=71>

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

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

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