UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL

MICROBIOLOGIA E BIOQUÍMICA APLICADAS (SHS 0312)

Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

Monitores: Me. Caroline F. Granatto
Me. Danilo H. Donato Rocha
Me. Francisco Rafael Sousa Freitas
Me. Henrique de Souza Dornelles

Apoio Técnico: Juliana Gonçalves dos Santos Custódio

São Carlos, 2020

Departamento de Hidráulica e Saneamento
shs.eesc.usp.br

CONTATOS

Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche: bernadetevaresche@gmail.com

Monitores:

Caroline F. Granatto: carol_granatto@hotmail.com
Danilo H. Donato Rocha: danilorocha21@usp.br
Francisco Rafael Sousa Freitas: freitas.sousa@gmail.com
Henrique de Souza Dornelles**:** henrique_dornelles@hotmail.com

Apoio Técnico:

Juliana Gonçalves dos Santos Custódio: jucust@sc.usp.br

SUMÁRIO

MANUAL DE BIOSSEGURANÇA 1

AULA PRÁTICA 1: COLUNA DE WINOGRADSKY 5

AULA PRÁTICA 2: MÉTODOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS 10

AULA PRÁTICA 4: CRESCIMENTO MICROBIANO 22

AULA PRÁTICA 5: TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) 30

AULA PRÁTICA 6: ANÁLISE MICROSCÓPICA DE LODO (LODOS ATIVADOS) 42

AULA PRÁTICA 7: DETERMINAÇÃO DA RESPIRAÇÃO BASAL DO SOLO 54

AULA PRÁTICA 8: METABOLISMO MICROBIANO E PROVAS BIOQUÍMICAS 59

AULA PRÁTICA 9: QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES FECAIS E TOTAIS – MÉTODO COLILERT 75

AULA PRÁTICA 10: BACTERIOCLOROFILA E CAROTENÓIDES DE BACTÉRIAS FOTOTRÓFICAS ANOXIGÊNICAS 84

MANUAL DE BIOSSEGURANÇA

INTRODUÇÃO

Este manual tem por objetivo descrever as orientações apropriadas sobre as normas de segurança e administração do ambiente de trabalho na Engenharia Ambiental dos Laboratórios Didáticos, de forma a diminuir a exposição desnecessária a risco de saúde e acidentes coletivos e pessoais.

A segurança no laboratório é uma preocupação de todo o pessoal. Uma boa prática laboratorial é fundamental para a segurança e não pode ser substituída por equipamento especial. A postura de cada colaborador, estagiário ou aluno no laboratório frente ao risco é que determinará uma prática laboratorial segura ou um acidente de trabalho. Em laboratórios químicos o acidente de trabalho raramente é restrito a quem o causou, mas as atitudes seguras de cada colaborador, aluno ou estagiário são extensivas aos demais e para a preservação da estrutura física do laboratório.

Cada laboratório deve assumir a responsabilidade em desenvolver planos para a proteção dos colaboradores antes da exposição a agentes químicos e biológicos. Quando trabalhamos com amostras de potencial de risco biológico (potencialmente infecciosas), cabe tratarmos todas como tal e toda manipulação de produto químico deve seguir as orientações do fabricante contidas no rótulo e FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico).

REGRAS BÁSICAS

Cada aluno deverá ter **seu próprio "kit de Segurança"** que incluirá:

- **Jaleco com as seguintes características:**
    1. **Comprimento: até a altura dos joelhos;**
    2. **Mangas compridas com fechamento, preferivelmente velcro;**
    3. **Confeccionado em algodão;**
- **Óculos de segurança;**
- **Luvas (látex) para procedimentos;**

O único material de segurança que não se encontra disponível no laboratório é o jaleco. Este é de uso pessoal e a aquisição é de responsabilidade do aluno. Os óculos e as luvas encontram-se no laboratório e estarão disponíveis sempre que se faça necessário seu uso.

RECOMENDAÇÕES GERAIS

O trabalho em laboratório exige concentração. Não converse desnecessariamente e não distraia seus colegas.

RECOMENDAÇÕES DE ORDEM PESSOAL

- No laboratório devem ser usados **SEMPRE OS EPI's:**

1. **Jaleco**: enquanto permanecerem no laboratório, os colaboradores, alunos e estagiários das áreas técnicas devem usar um avental de mangas compridas fechado na frente. É **EXPRESSAMENTE PROIBIDA** a entrada de pessoas no laboratório com trajes inadequados para qualquer finalidade. O vestuário de proteção (jaleco) deve ser lavado em intervalos apropriados a fim de assegurar a sua limpeza (contaminações em geral) e deve ser trocado imediatamente quando for visivelmente contaminado por materiais ou produtos. O vestuário deve ser colocado e transportado em sacos plásticos devidamente fechados.
2. **Sapatos fechados e preferivelmente sem salto:** os sapatos devem ser confortáveis, cobrir os pés por inteiro e ter preferencialmente solado antiderrapante ou de borracha. É expressamente proibido o uso de sandálias, chinelos ou qualquer tipo de calçado que não cubra os pés em sua totalidade. É aconselhável não utilizar sapatos com salto alto no laboratório.
3. **Calças compridas, preferivelmente jeans;**
4. **Cabelos compridos devem ficar presos;**

Outros tipos de EPI como máscaras, luvas para alta temperatura, aventais e escudos de segurança, podem ser necessários em algumas situações e para tanto solicitar ao professor ou a técnica do laboratório com antecedência. **O não cumprimento de qualquer um desses itens impossibilitará o aluno de assistir e participar da aula prática que estará sendo ministrada.**

- Use sempre que recomendado óculos de segurança quando estiver no laboratório. Quando se manuseia materiais cáusticos ou tóxicos e materiais potencialmente infectantes é obrigatório o uso de óculos de proteção, escudos faciais ou outros equipamentos que

protegem os olhos e a face. As lentes de contato, especialmente as gelatinosas, absorvem solventes e vapores. Portanto, representam um risco em caso de respingos e derrame. As lentes de contato não protegem contra respingos, e podem ainda concentrar substâncias cáusticas de encontro à córnea ou dificultar a lavagem natural da córnea por parte das lágrimas. Quando se trabalha com agentes que podem causar infecção através das mucosas ou da pele, ou quando existe o risco de respingos, deve-se usar máscaras combinadas com proteção dos olhos, tais como: óculos de proteção ou óculos com escudos laterais sólidos. Para os usuários de óculos ou lentes de contato torna-se obrigatório, portanto, o uso de óculos de segurança.

- Certifique-se da localização dos equipamentos de segurança coletivos: extintores de incêndio, lava-olhos e chuveiros de emergência.
- Certifique-se da localização das saídas de emergência;
- Não pipete nenhum tipo de produto com a boca;
- Não misture material do laboratório com seus pertences pessoais;
- Não leve as mãos a boca ou aos seus olhos quando estiver manuseando amostras ou produtos químicos;
- Lave cuidadosamente as mãos com bastante água e sabão antes de sair do laboratório. Caso vá ao banheiro durante as aulas práticas lave as mãos antes e depois do uso de toalete. Caso saia para se alimentar ou fumar, as mãos também devem ser lavadas. As mãos ainda devem ser lavadas imediatamente após o contato acidental com esgoto, lodo ou quaisquer tipos de materiais contaminados.
- **Nunca consuma ou coloque nenhum tipo de alimento nas bancadas, armários, geladeiras e estufas do laboratório**. Comidas, bebidas e outros artigos que geram contato potencial entre as mãos e a boca são proibidos nas áreas técnicas. Amostras como esgoto, lodo entre outras que contém uma variedade de organismos patogênicos, são manuseadas diariamente nas áreas técnicas e armazenadas nas geladeiras. São fonte potencial de contaminação de comidas e bebidas. Não se permite armazenar comida ou bebidas nos refrigeradores dos setores técnicos, pois nestes são armazenadas amostras para análise.
- Nunca utilize vidraria de laboratório como utensílio doméstico;
- **Nunca fume nas dependências do laboratório**. Materiais em combustão são uma causa potencial de ignição de solventes inflamáveis.

- Nunca aplique cosmético no laboratório.
- Objetos perfurocortantes: deve-se usar extrema cautela no manuseio de objetos contundentes, como tesouras, facas, estiletes e cacos de vidro. Dirija-se ao professor ou a técnica caso ocorra algum acidente desta natureza e busque sempre orientação de como se deve proceder.
- No laboratório não se deve correr a fim de evitar choques, derramamento de material e acidentes.

Pede-se a compreensão e colaboração de todos para que se possa conviver em ambiente mais seguro. Acidentes acontecem sempre e normalmente quando menos esperamos. Estas recomendações não anulam a possibilidade de acontecer algum acidente, mas a não aplicação delas pode causar acidentes de dimensões que variam as vezes irreparáveis. Seja consciente, tenha uma conduta segura!

AULA PRÁTICA 1: COLUNA DE WINOGRADSKY

INTRODUÇÃO

Os estudos ecológicos de Willen Beijerinck e Sergei Winogradsky acerca das comunidades microbianas em seus ambientes naturais permitiram compreender as características metabólicas dessas comunidades, assim como esclarecer as etapas do ciclo de alguns elementos, tais como, carbono, nitrogênio e enxofre.

Um método simples para estudo da diversidade microbiana e de características metabólicas é a partir da construção da coluna de Winogradsky, que consiste em um microssistema fechado com condições para favorecer o crescimento de determinadas comunidades por meio do enriquecimento de uma amostra de solo com nutrientes. Ao modificar-se de forma parcial ou total o enriquecimento de nutrientes aplicado ao meio de estudo assim como as condições de incubação, consegue-se selecionar microrganismos com características específicas, de forma que há uma enorme quantidade de variações possíveis.

Variações possíveis na escolha das fontes de enriquecimento (Malajovich, 2015)

1. *Fontes de carbono:* Materiais que liberam carbono rapidamente tais como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio ou carbonato de cálcio (giz moído). Ou materiais de origem vegetal que liberam carbono mais lentamente, tais como grama, feno, papel jornal, papel higiênico, amido de milho, aveia, serragem, etc.
2. *Fontes de enxofre:* Enxofre, sulfato de cálcio, sulfato de magnésio, ovos, etc.
3. *Fontes de ferro:* Limalha de ferro, qualquer comprimido contendo ferro.
4. *Fontes de fósforo e potássio*: Fertilizantes para plantas com K_2HPO_4
5. *Fontes de vitaminas:* Qualquer produto multivitamínico.

Cada zona da coluna é preferencial para o desenvolvimento de determinados microrganismos, condicionados pela disponibilidade de nutrientes, carbono e tolerância às condições do meio. Em uma montagem convencional da coluna de Winogradsky ocorre o aparecimento de algas e cianobactérias na camada mais superficial, de forma a produzirem oxigênio e manterem esta zona aeróbia. No fundo, a degradação da celulose pelas bactérias leva a liberação de glicose, criando um ambiente anaeróbio e com condições para o desenvolvimento da fermentação.

Na zona anaeróbia ocorre o crescimento de microrganismos anaeróbios ou fermentativos, os processos de decomposição fermentativos produzem ácidos orgânicos, álcoois e H_2, que são substrato para as bactérias redutoras de sulfato que obtém energia mediante respiração anaeróbia. Ocorre à redução de sulfato e S^0 a H_2S, que se difunde pela coluna criando um gradiente de H_2S inverso ao de oxigênio, instaurando um conjunto de reações de oxidação e redução característico do ciclo do enxofre. Este H_2S por sua vez, é utilizado por bactérias sulfurosas verdes e púrpuras convertendo a enxofre elementar, estas bactérias sulfurosas se desenvolvem de forma estratificada ao longo da coluna de acordo com a quantidade de sulfeto disponível.

Uma representação esquemática das zonas desenvolvidas na coluna de Winogradsky em função dos gradientes de oxigênio e sulfeto, e da predominância ou não da incidência de luz solar, pode ser observada na Figura 1.1. É muito improvável a obtenção de todos os grupos de microrganismos descritos ao mesmo tempo, entretanto pode-se observar sua sucessão ao longo do tempo, na Tabela 1.1 é possível observar os microrganismos que se desenvolvem ao longo das zonas da coluna, assim como uma breve descrição de suas características metabólicas.

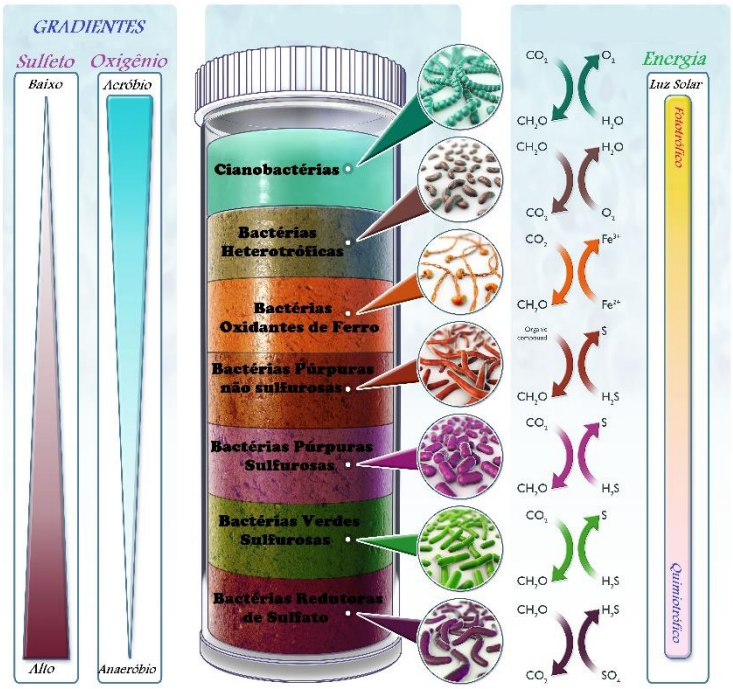


Figura 1.1. Representação esquemática da Coluna de Winogradsky, descrevendo a microbiota presente e as principais reações que de desenvolvem em cada zona da coluna de sedimentos.

Fonte: http://www.hhmi.org/biointeractive/poster-winogradsky-column-microbial-evolution-bottle

Tabela 1.1. Descrição dos diversos grupos de microrganismos que se desenvolvem nas zonas da coluna de Winogradsky em função dos gradientes que se estabelecem.

O_2	SH_2	SO_4	ZONA DA COLUNA	MICRORGANISMOS	CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS
↓	↑	↓	AERÓBIA Água	Protozoários, Algas, Cianobactérias	Microrganismos quimio-hetrotróficos Microrganismos foto-autotróficos (fotossíntese oxigênica)
			MICROAERÓFILA Interface água-lodo	Bactérias sem pigmentos que oxidam o SH_2 (*Beggiatoa, Thiobacillus, Thiotrix*)	Microrganismos quimio-autotróficos Obtém energia por oxidação do SH_2 proveniente das camadas inferiores a sulfato ou enxofre; sintetizam sua própria matéria orgânica a partir de CO_2. Estes microrganismos turvam a água; *Beggiatoa* forma filamentos; os *Thiobacilli* podem oxidar S, SH2, tiossulfato e Fe.
			ANAERÓBIA SUPERIOR Lodo pobre em H_2S	Bactérias vermelhas e verdes não dependentes do enxofre (*Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodobacter, Chloroflexus*)	Microrganismos foto-heterotróficos Trata-se de um grupo de bactérias muito versáteis que obtêm energia por fotossíntese anoxigênica, utilizando como fonte de carbono os ácidos orgânicos do meio, açúcares ou álcool. Na escuridão, são capazes de respirar ou fermentar. Fixam N_2. Estas bactérias são inibidas por altas concentrações de SH_2. Geralmente, formam manchas de cor vermelho ferrugem.
			ANAERÓBIA MÉDIA Lodo rico em H_2S	Bactérias vermelhas (púrpura) dependentes do enxofre (*Chromatium*) Bactérias verdes dependentes do enxofre (*Chlorobium*)	Microrganismos foto-autotróficos. Estas bactérias absorvem a energia luminosa e fotossintetizam utilizando, em vez de H_2O, o SH_2 como fonte de H_2. Não produzem oxigênio. Acumulam ou excretam S. Sua fonte de carbono é o CO_2.
			ANAERÓBIA INFERIOR Lodo enriquecido com enxofre e celulose	Bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*)	Microrganismos quimio-heterotróficos. Obtém energia por respiração anaeróbia utilizando sulfato (ou enxofre) como aceptor alternativo de elétrons e produzindo SH_2 que se difunde em direção às camadas superiores. Sua fonte de carbono são os produtos de fermentação da camada bacteriana inferior.
				Bactérias estritamente anaeróbias (*Clostridium*)	Microrganismos quimio-heterotróficos. Obtém energia por fermentação da glicose liberada por digestão da celulose. Sua fonte de carbono é a celulose. Formam compostos orgânicos simples que se difundem na camada superior.

Fonte: https://bteduc.com/guias/28_Analise_De_Uma_Coluna_De_Winogradsky.pdf

OBJETIVO

Verificar o desenvolvimento de comunidades microbianas em função do gradiente de aerobiose e do tempo.

Princípio

Uma coluna de sedimentos coletados em corpo d'água é colocada em um tubo transparente, com adição de fonte de carbono, enxofre e cálcio, e cobertos com água, permanecendo fechada e sob iluminação. Com o tempo comunidades microbianas crescem diferencialmente em estratos de acordo com o nível de oxigênio e com os aceptores e doadores de elétrons presentes. De forma que é possível visualizar os estratos ao longo do tubo por diferenciação de cores.

MATERIAIS:

- Frasco transparente de 500 ml
- Espátula
- Béquer de 500 ml
- Béquer de 250 ml
- Copo Plástico
- Funil
- Palito de madeira para churrasco
- Luvas de látex descartáveis
- 400 g de sedimento fresco de rio ou lago
- 0,5 ml de água de rio ou lago
- 4 g de papel picado
- 1 Ovo

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

1. Em um copo plástico, misturar 50 g do sedimento fresco, 4 g de papel picado (fonte celulose) e um ovo quebrado com casca moída (fonte de Ca e S);
2. Transferir a mistura de sedimento com papel e ovo para o interior do frasco transparente, com o auxílio de uma espátula e do palito de madeira;
3. Adicionar mais 350 g de sedimento fresco (medido em um béquer de 500 ml) ao frasco transparente;
4. Pressionar o conteúdo do frasco transparente, de forma a forçar que todo ar saia;
5. Adicionar água coletada do rio/lago (preservada em geladeira a 4°C) ao frasco transparente (mantendo livre uma altura de 5 cm até a borda do frasco), cuidadosamente para que ocorra o mínimo de perturbação na superfície do substrato.
6. Fechar a tampa do frasco de forma não hermética, limitando a evaporação da água, mas sem impedir uma ligeira oxigenação do meio;

7. Colocar a coluna junto a uma janela, ou outro local aberto, e manter sem movimentação e com iluminação periódica pela luz solar;
8. Monitorar o desenvolvimento das colônias por um período de 14 semanas, registrando as alterações ocorridas ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Malajovich, M. A. Como montar uma coluna de Winogradsky?. Guias de atividades Biotecnologia: ensino e divulgação, 2015. Disponível em: http://www.bteduc.bio.br.

Building a Winogradsky Column. An Educator Guide with Activities in Astrobiology. http://quest.nasa.gov/projects/astrobiology/fieldwork/lessons/Winogradsky_5_8.pdf

Deacon, J. The Microbial World: Winogradsky column: perpetual life in a tube. http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/winograd.htm

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 2: MÉTODOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Métodos físicos e químicos de controle do crescimento microbiano

Os microrganismos podem ter seu crescimento controlado por agentes químicos e físicos, os quais podem atuar eliminando totalmente os microrganismos ou impedindo seu crescimento, criando condições nas quais eles não podem se reproduzir. Uma grande variedade de métodos pode ser utilizada.

O controle do crescimento dos microrganismos é muito importante e necessário nas áreas das Ciências da Saúde. Como exemplos da aplicação dos métodos de controle, temos a prevenção das infecções hospitalares por procedimentos e técnicas adequadas que vão desde o modo correto de lavar as mãos até os processos indicados, de acordo com normas do Ministério da Saúde, para limpar, esterilizar e/ou desinfetar artigos, equipamentos e superfícies hospitalares. O processo correto garante o nível adequado de microrganismos, o que é imprescindível para a segurança nos atendimentos aos pacientes e da equipe.

No campo industrial, vários métodos de controle microbiológico podem ser aplicados, e este controle faz parte das etapas que garantem a qualidade dos produtos que podem ser alimentos, medicamentos, cosméticos e água entre outros.

Em laboratórios de pesquisa e também de análises clínicas estes métodos estão presentes no preparo de meios de cultura, esterilização de vidraria como pipetas, placas de Petri, ponteiras e vários outros materiais.

Em indústrias alimentícias, noções básicas de limpeza, desinfecção e assepsia também são importantes no preparo dos alimentos, visando uma maior durabilidade destes.

Deste modo vemos a importância da correta aplicação dos métodos químicos e físicos de controle dos microrganismos em várias áreas. A escolha dos métodos depende dos objetivos, do tipo de material e do nível de controle desejado.

Conceitos importantes

- **Limpeza:** importante no controle do crescimento dos microrganismos. A simples remoção mecânica da sujeira retira os compostos que poderiam ser usados como nutrientes pelos microrganismos, como a matéria orgânica (sangue, vômito, soro,

detritos alimentícios etc.). A limpeza também remove o pó, terra, matéria inorgânica (sais), além de remover microrganismos.

- **Descontaminação:** realizada com agentes químicos ou físicos com objetivo de remover agentes contaminantes, como fluidos e secreções corporais com agentes infecciosos.
- **Sanitização:** tratamento que leva à diminuição da vida microbiana nos utensílios alimentares e equipamentos de manipulação de alimentos até os níveis seguros de saúde pública. Processo realizado com agentes químicos que podem ser sabão ou detergente e desinfetantes do tipo sanitizantes.
- **Desinfecção:** eliminação parcial (ou redução) do número de microrganismos (principalmente patogênicos) presentes em um material inanimado. É feita por agentes químicos – os desinfetantes. Pode também ser realizada por métodos físicos, como água em ebulição. Existem basicamente três tipos:

Desinfecção de baixo nível: os agentes químicos usados têm ação contra a maioria das bactérias, alguns vírus e fungos, mas não inativam microrganismos mais resistentes como micobactérias e endósporos.

Desinfecção de nível intermediário: Os agentes destroem a maioria das bactérias incluindo as micobactérias, mas não os endósporos.

Desinfecção de alto nível: Os agentes são eficientes contra todos os microrganismos, exceto os endósporos.

- **Antissepsia:** semelhante à desinfecção, porém relacionada a tecidos vivos. É feita por meio de agentes químicos, denominados antissépticos.
- **Esterilização:** é a eliminação total dos microrganismos e esporos. Métodos físicos e químicos podem ser usados.

Alvos celulares

Existem diferentes alvos nos quais os agentes químicos e físicos podem atuar impedindo o crescimento dos microrganismos ou eliminando-os totalmente.

- **Parede Celular:** protege os procariotos da lise osmótica. Agentes antimicrobianos que têm como alvo estas estruturas levam à morte celular por lise osmótica.
- **Membrana Citoplasmática:** uma de suas funções é o controle da passagem de nutrientes para a célula e a eliminação de substâncias tóxicas. Alguns agentes

antimicrobianos podem danificar esta estrutura, o que acarreta perda da sua integridade.

- **Enzimas e Proteínas:** agentes que atuam nestas moléculas tais como o calor e alguns agentes químicos rompem as pontes de hidrogênio, dissulfeto ou covalentes, levando à desnaturação da proteína ou enzima com perda de suas funções celulares. Ocorre uma alteração do metabolismo celular e da síntese de proteínas.
- **DNA e RNA:** os ácidos nucléicos são a fonte de informação celular. Danos nestas moléculas decorrentes de agentes físicos, como radiações, calor ou agentes químicos levam à morte celular por impedir a replicação celular e a síntese de proteínas e enzimas.

Métodos de controle do crescimento microbiano

Tabela 2.1. Métodos físicos e químicos de controle de microrganismos.

Métodos físicos	Temperatura Radiação Filtração Dessecação Remoção de O_2 Vibração ultrassônica
Métodos químicos	Desinfetantes Antissépticos Preservativos usados em alimentos

MÉTODOS FÍSICOS

Os métodos físicos são usados para promover a descontaminação, a desinfecção e a esterilização. Os métodos empregados usam como princípio o calor, as radiações e a filtração.

- **Temperatura:**

- *Calor seco e úmido* – método seguro, de baixo custo e não forma produtos tóxicos. Acima da temperatura ideal de crescimento o calor vai promover a desnaturação de proteínas estruturais e enzimas, levando à perda da integridade celular e morte. O calor seco elimina os microrganismos também por processo de oxidação. O calor úmido na forma de vapor tem mais poder de penetração e elimina as formas vegetativas dos procariotos, vírus,

fungos e seus esporos. A morte por calor é uma medida exponencial que ocorre à medida que a temperatura se eleva.

Todos os microrganismos são sensíveis ao calor, entretanto os endósporos bacterianos, devido às características peculiares em sua estrutura, são mais resistentes. Para serem destruídos, são necessárias temperaturas acima de 100ºC, com tempos variáveis dependentes da espécie de procarioto.

Métodos que empregam calor úmido: autoclave, pasteurização, água em ebulição.

Métodos que empregam o calor seco: estufa, forno, flambagem e incineração.

- *Baixas temperaturas* – controla os microrganismos pela diminuição da taxa de crescimento e da atividade enzimática. Pode não causar a morte celular.

- **Radiação:**

- *Radiação ionizante* – raios-X com comprimento de onda de 0,1-40 nm e radiação gama (γ) com comprimentos até menores são radiações ionizantes porque possuem energia para retirada dos elétrons das moléculas, ionizando-as. A principal molécula ionizada é a água, com formação de radicais tóxicos que levam à perda de elétrons por várias moléculas e formação de radicais livres. A ação mais prejudicial é no DNA, mas atingem outras moléculas como proteínas. Leva à morte celular.

- *Radiação ultravioleta* – esta radiação não-ionizante tem sua atividade microbicida na faixa de comprimento de onda 240-280 nm, sendo 260 nm o comprimento mais efetivo para eliminação de microrganismos. Este tipo de radiação é mutagênica e leva à formação de dímeros de timina que impedem a ação da DNA polimerase.

- *Micro-ondas* – é a radiação com os maiores comprimentos de onda do espectro eletromagnético (1 nm a 1m). Os fornos micro-ondas caseiros não podem ser usados para esterilizar.

- **Filtração:** pode ser usada para esterilizar gases e líquidos que são sensíveis ao calor. Os filtros são compostos por grande variedade de materiais sintéticos. Existem diferentes tamanhos de poros de acordo com a filtragem que se deseja.

Tabela 2.2. Tamanhos de poros de membranas em relação aos microrganismos que podem atravessá-las.

Tamanho dos poros (μm)	Partículas filtráveis
5	Leveduras, procariotos, vírus e moléculas
3	Algumas leveduras, procariotos, vírus e moléculas
1,2	Maioria dos procariotos, vírus e moléculas
0,45	Alguns procariotos, vírus e moléculas
0,22	Vírus e moléculas
0,10	Alguns vírus (médios)
0,05	Pequenos vírus e moléculas
0,025	Vírus muito pequenos e moléculas

- **Dessecação:** os métodos que usam esse princípio removem a água, controlando o crescimento dos microrganismos.

- *Liofilização* – é o congelamento rápido do material sob N2 e posterior remoção da água por sublimação, sendo convertida diretamente do estado sólido para o gasoso.

- *Defumação* – consiste na diminuição do teor de água por exposição dos alimentos durante horas ou dias à fumaça de madeira em combustão.

- **Remoção do oxigênio:** previne o crescimento de microrganismos aeróbios.
- **Vibração ultrassônica:** consiste em vibrações sonoras de alta frequência que levam ao rompimento da célula, despolimerização de compostos e quebra do DNA. Não esteriliza.

MÉTODOS QUÍMICOS

- **Desinfetantes:** compostos químicos que podem matar ou inibir o crescimento dos microrganismos; são usados em superfícies e objetos inanimados. Existem métodos para avaliar a eficácia destes desinfetantes que são o coeficiente fenólico e método da diluição de uso.

- *Coeficiente fenólico* – é um processo clássico, cujo objetivo é realizar uma comparação de atividade germicida de determinado desinfetante-teste com a atividade do fenol em condições padronizadas.

- *Método da diluição de uso* – determina a concentração apropriada do desinfetante e faz uma comparação de diferentes desinfetantes entre si.

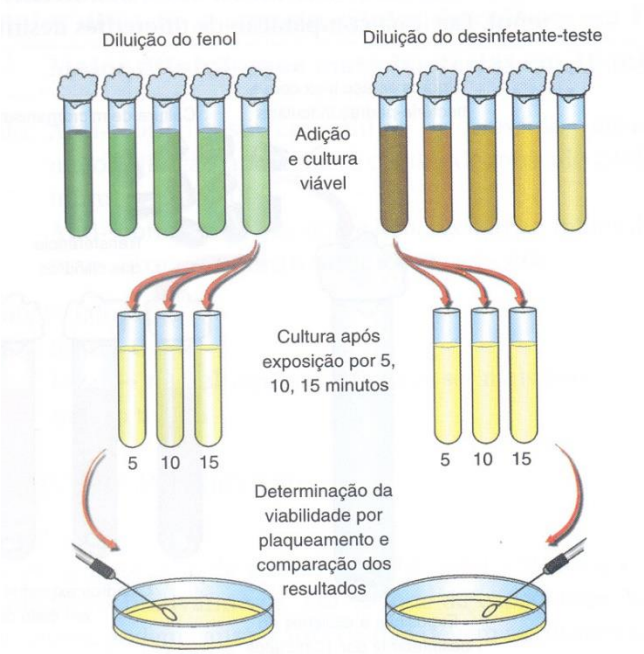


Figura 2.1. Teste de determinação do coeficiente fenólico (CF). As soluções de fenol e do desinfetante-teste são diluídas e inoculadas com a cultura dos microrganismos por determinados intervalos de tempo. Após esse procedimento, a viabilidade da cultura é avaliada em placas de Petri com meio de cultura sem os desinfetantes.

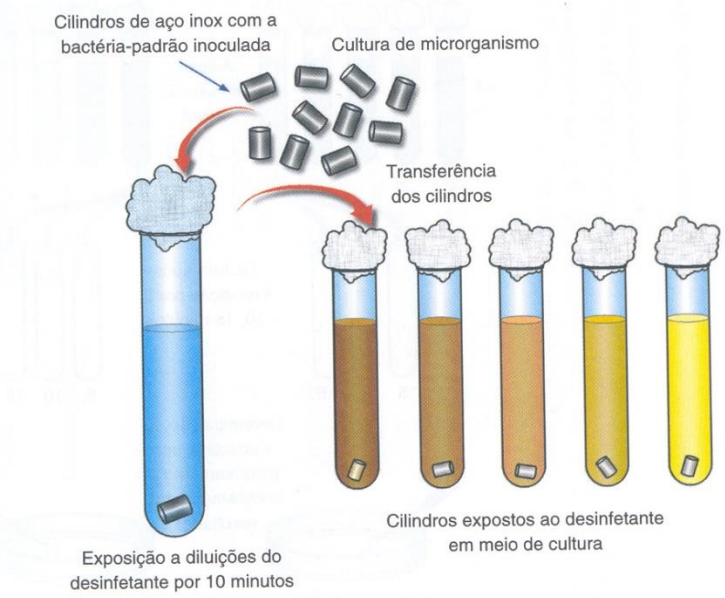


Figura 2.2. Método de diluição de uso. Neste método cilindros de aço inox são contaminados com a bactéria-teste e colocados na presença de diluições do desinfetante. Após 10 minutos, os cilindros são adicionados em meio de cultura para avaliar sua viabilidade.

Antissépticos: agentes químicos para uso tópico em tecidos vivos. Não podem ser ingeridos.

Tabela 2.3. Agentes químicos: desinfetantes e antissépticos.

Categoria	Mecanismo de ação	Agente químico	Uso
Agentes alquilantes	Alquilam grupos -COOH, -OH e $–NH_2$	Glutaraldeído	**Desinfetante** Artigos termossensíveis, equipamentos de anestesia gasosa, conexões e acessórios de respiradores artificiais, endoscópios de fibra ótica, artigos não descartáveis, metálicos ou corrosivos com hipoclorito, instrumental odontológico, equipamentos de aspiração **Esterilizante** Artigos críticos, termossensíveis como enxertos de acrílico, cateteres, drenos, tubos de poliestireno ou náilon
		Formaldeído	**Desinfetante** Capilares dos sistemas de dialisadores **Esterilizante** Enxertos de acrílico, cateteres, drenos, tubos de poliestireno, instrumental, laparoscópios, artroscópios, ventiloscópios
		Óxido de etileno	**Esterilizante** Usado para esterilizar marcapassos, próteses, instrumentos de hemodinâmica, acessórios e respiradores, materiais de borracha (luvas cirúrgicas, cânula endotraqueal), materiais de plástico (cateteres, equipos) e materiais com fibra ótica como laparoscopia, artroscopia
Fenóis	Desnaturam proteínas	Fenol, alquil fenóis (orto, meta e para cresóis) etc.	**Desinfetante** Usado para desinfecção de superfícies, artigos metálicos e de vidro
		Derivados com cloro: hexaclorofeno	**Antisséptico** Em sabões, *sprays*, cosméticos etc.
Biguanidas	Danificam membranas citoplasmáticas	Clorexidina	**Antisséptico** Para peles e mucosas
Halogênios	Oxidam grupos –SH, $-NH_2$ de proteínas	Cloro e hipoclorito de sódio	**Desinfetante** Usado na desinfecção hospitalar e da água. Em hospitais, é usado para unidades de diálise, hemodiálise, bancos de sangue, laboratórios, lactários e qualquer superfície contaminada
		Iodo	**Desinfetante** Ampolas de vidro, termômetros, estetoscópio, otoscópios, superfície externa de equipamentos metálicos, partes metálicas de incubadoras, macas, camas, equipamentos

cont. Agentes químicos: desinfetantes e antissépticos.

			metálicos de cozinhas, bancadas etc. **Antisséptico** Tecidos e feridas
Agentes surfactantes: quaternários de amônio (QUATS)	Danos na membrana citoplasmática	Cloreto de benzalcônio	**Desinfetante** Usado em superfícies e equipamentos na área de alimentação
Peróxidos	Agentes oxidantes. Ação na membrana citoplasmática, no DNA e em outros componentes celulares	Peróxido de hidrogênio	**Desinfetante** Usado para artigos semicríticos, lentes e equipamentos de ventilação respiratória **Esterilizante** Indústria de alimentos para filtros e tubulações. Na forma de plasma esterilizante para tecidos e líquidos, instrumentos de metal, endoscópios, câmeras de vídeo, desfibriladores, equipamentos de terapia para radiação **Antisséptico** Inibe o crescimento de anaeróbios
		Ácido paracético	**Desinfetante** Grande variedade de materiais e instrumentos
		Ozônio	**Desinfetante** Desinfecção de água
Álcoois	Desnaturação de proteinase, desorganização de lipídeos da membrana	Álcoois etílico e isopropílico	**Desinfetante** Desinfecção de artigos e superfícies **Antisséptico** Pele
Metais pesados	Desnaturação de proteínas	Nitrato de prata, sulfito de cobre	**Germicida ou antisséptico** Mucosas
Corantes	Inibe a síntese da parede celular	Violeta de genciana (cristal violeta)	**Germicida** Para a levedura *Candida albicans*

PARTE EXPERIMENTAL

INTRODUÇÃO

Certas áreas do nosso corpo como mãos, pés, boca e axilas podem conter um número muito grande de microrganismos. Nas mãos podem estar presentes microrganismos que, juntamente com os alimentos, podem ser ingeridos causando doenças, ou ainda, serem levados para os olhos ou ouvidos onde podem provocar infecções.

Na cavidade oral também crescem muitos microrganismos, alguns deles responsáveis pela cárie, ou ainda, doenças periodontais. O mau cheiro de alguma destas áreas é em decorrência da ação de microrganismos.

Uma boa higienização (lavar as mãos, usar antissépticos bucais e desodorantes, etc.) pode evitar estes tipos de problemas.

A desinfecção é definida como a eliminação parcial dos microrganismos presentes em um determinado ambiente. Os métodos de desinfecção visam principalmente destruir as formas microbianas patogênicas ao homem, através da utilização de um agente desinfetante ou agente antimicrobiano.

O grau de eficiência dos agentes antimicrobianos é dependente da concentração ou da intensidade, das condições do ambiente e do estado das células.

OBJETIVO

Demonstrar a presença de microrganismos na pele humana e as alterações no seu número e na sua diversidade com as práticas de desinfecção.

MATERIAIS

- 5 placas Petri
- Ágar Nutritivo
- Álcool 70%
- Solução de iodo
- Sabonete
- Antisséptico bucal
- Água oxigenada 10 volumes
- *Swabs* estéreis

PROCEDIMENTOS

Parte I

1. Dividir as placas de Petri contendo o meio ágar nutriente em duas zonas (A e B, C e D, E e F) pela parte inferior.
2. Identificar a placa, anotando na tampa: nome, data e turma.

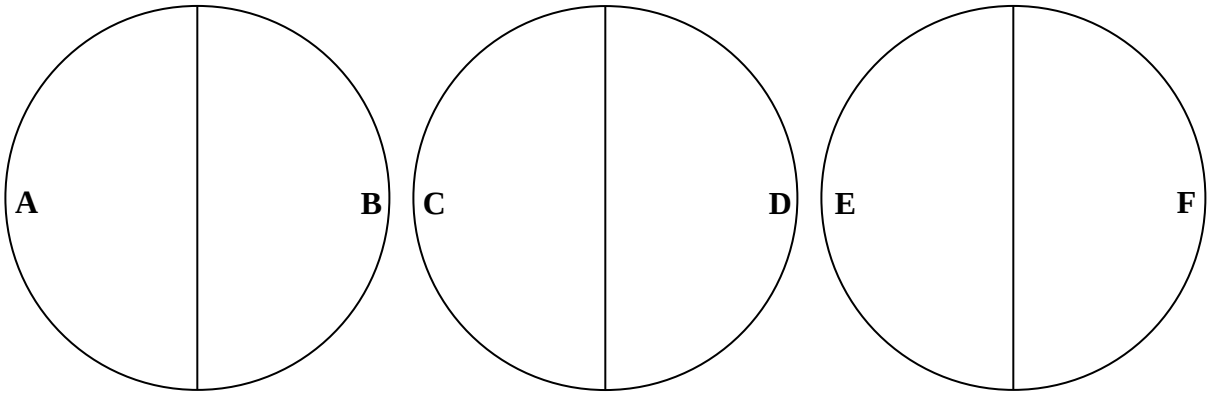


Figura 2.3. Esquema representativo da divisão em zonas das placas de Petri.

INOCULAÇÃO

A	CONTROLE
B	DEDO SEM DESINFETANTES
C	SOLUÇÃO DE IODO
D	SABONETE LÍQUIDO
E	SABONETE EM BARRA
F	ÁGUA OXIGENADA
G	ÁLCOOL 70%
H	BOCHECHA SEM ENXAGUANTE BUCAL
I	BOCHECHA COM ENXAGUANTE BUCAL

3. Manter a área “A” como testemunha, não inoculada.
4. Escolher um dedo da mão e, sem lavar, colocá-lo em contato com a superfície do meio de cultura na área da placa assinalada com “B”, descrevendo um movimento em zigue-zague.
5. Lavar as mãos com solução de iodo, secar ao ar e em seguida colocar o mesmo dedo em contato com a área “C”, repetindo o movimento em zigue-zague.
6. Em um dedo diferente e não lavado, esfregar um chumaço de algodão embebido em sabonete líquido, lavar, secar ao ar e colocar em contato com a área “D”, repetindo o movimento em zigue-zague.
7. Em um dedo diferente e não lavado, esfregar o dedo no sabonete em barra, lavar, secar ao ar e colocar em contato com a área “E”, repetindo o movimento em zigue-zague.
8. Em um dedo diferente e não lavado, esfregar um chumaço de algodão embebido em água oxigenada 10 volumes, secar ao ar e colocar em contato com a área “F”, repetindo o movimento em zigue-zague.
9. Em um dedo diferente e não lavado, esfregar um chumaço de algodão embebido em álcool 70%, lavar, secar ao ar e colocar em contato com a área “G”, repetindo o movimento em zigue-zague.

Parte II

1. Dividir as placas de Petri contendo o meio ágar nutriente em duas zonas
2. Identificar a placa, anotando na tampa: nome, data e turma.
3. Escrever no canto superior esquerdo **“antes do bochecho”** e no direito **“após o bochecho”**.
4. Molhar o *swab* estéril na saliva do espaço entre a mucosa bucal e os dentes (deixar o *swab* no local por 30 segundos) e fazer movimentos em zigue-zague na metade da placa indicada;
5. No banheiro, fazer bochecho por 15 segundos com o antisséptico bucal, diluído ou não, conforme instruções da embalagem;
6. Colher a saliva novamente com um *swab* limpo;
7. Repetir os movimentos em zigue-zague na outra metade da placa.

Manter todas as placas fechadas e invertidas, na temperatura de 30°C, por 48 horas. Avaliar os resultados, observando a diversidade (tipos) e a abundância relativa de colônias.

Avaliação	**Tratamentos**							
	A	B	C	D	E	F	Antes do bochecho	Depois do bochecho
Nº de colônias								
Diversidade (1)								

(1) Critérios: grande (+++); média (++); pequena (+); ausente ( )

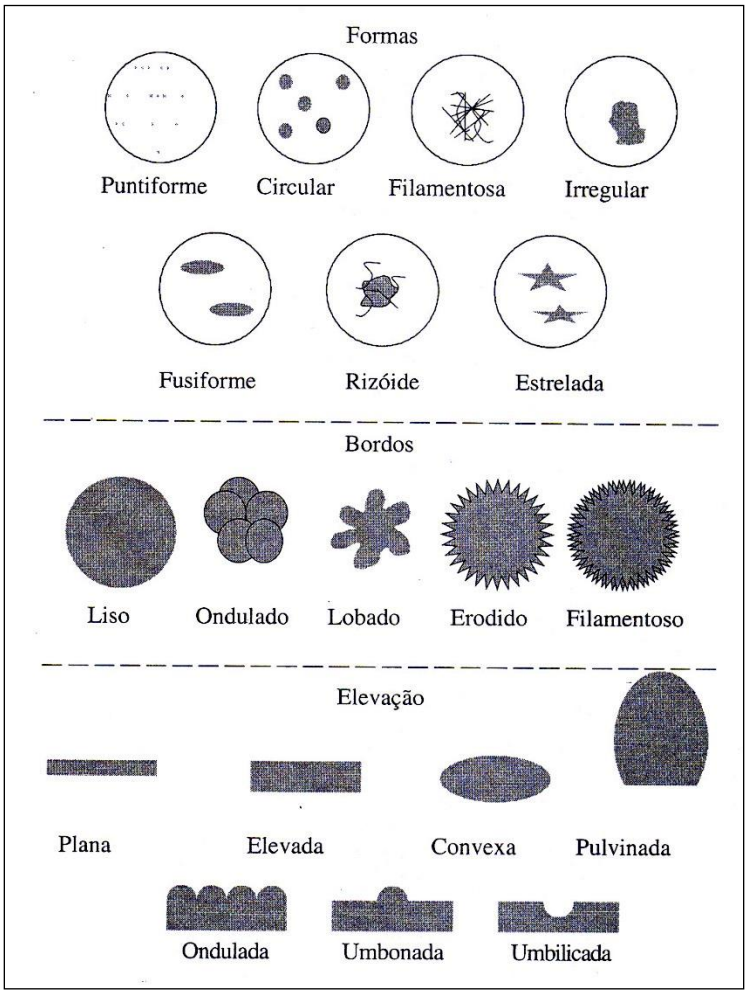


Figura 2.4. Morfologia das colônias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Germano Nunes Silva Filho e Vetúria Lopes de Oliveira. *Microbiologia – Manual de Aulas Práticas*. Editora da UFSC, 155p., 2004.

Ana Beatriz Vermelho, Antônio F. Pereira, Rosalie R. R. Coelho e Thais Souto-Padrón. *Práticas de Microbiologia*. Guanabara Koogan, 239p., 2006.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 3: TÉCNICAS PARA INOCULAÇÃO DE CULTURA MICROBIANA

OBJETIVO

Diferenciar os procedimentos de inoculação de culturas microbianas e suas aplicações.

TÉCNICAS

DILUIÇÃO EM SÉRIE

MATERIAL

- Suspensão bacteriana
- Tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina esterilizada
- Alça de transferência

PROCEDIMENTO

1. Transferir **8 alças** da suspensão bacteriana **(tubo A – amostra bruta, 10^0)** para o **tubo B (10^{-1})**. Tomar as precauções de assepsia e esterilizar a alça de platina de transferência antes e após usá-la;
2. Agitar;
3. Transferir **8 alças** do tubo B para o **tubo C (10^{-2})**;
4. Agitar;
5. Transferir **8 alças** do tubo C para o **tubo D (10^{-3})**;
6. Agitar os tubos B, C e D.

MÉTODO DAS ESTRIAS

MATERIAL

- Suspensão de microrganismos **(tubo A – amostra bruta, 10^0)**
- Alça de platina para transferência da suspensão
- Placa de Petri com ágar nutritivo

PROCEDIMENTO

1. Esterilizar a alça de transferência no bico de gás;
2. Introduzir a alça de transferência no tubo de ensaio que contém a suspensão de microrganismos (tubo A) (esfria-se a alça de transferência na própria suspensão de microrganismos, de preferência na região lateral superior) e coletar a amostra da suspensão;

3. Levar a alça até a superfície do meio de cultura sólido que está na placa de Petri e dar um leve toque na mesma, próximo a parede da placa de Petri (a partir desse ponto inicia-se o processo de estrias);

4. Incubar as placas de Petri contendo os microrganismos a 37ºC durante 48 horas.

ALÇA DE DRIGALSKY

MATERIAL

- Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar nutritivo
- Álcool
- Alça de Drigalsky
- Pipeta esterilizada de 1 ml ou micropipeta de 1 ml
- Álcool

PROCEDIMENTO

1. Introduzir a alça de Drigalsky no álcool e em seguida flambá-la na chama do bico de gás. Esfriá-la na tampa da placa de Petri (**este processo deverá ser efetuado a cada espalhamento**). Fazer o espalhamento com a alça de Drigalsky estéril;

2. Com uma pipeta de 1 ml esterilizada (ou micropipeta com ponteira estéril), inocular, **separadamente**, **0,1 ml** de cada tubo da diluição (10^0 e 10^{-3}) em placa de Petri contendo ágar nutritivo;

3. Incubar as placas de Petri contendo os microrganismos a 37ºC durante 48 horas.

MÉTODO DA PLACA DERRAMADA OU *POUR PLATE*

MATERIAL

- Suspensão bacteriana
- Tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar nutritivo liquefeito e resfriado a 45°C-50°C
- Placa de Petri esterilizada

PROCEDIMENTO

1. Pipetar 2 ml de amostra nas placas de Petri esterilizadas. Usar as amostras **tubo A – (10^0)** e **tubo D (10^{-3}).**

2. Acrescentar 20 ml de ágar nutritivo.

3. Agitar as placas de Petri fazendo movimentos de **8**.

4. Deixar solidificar.

5. Incubar as placas de Petri contendo os microrganismos a 37ºC durante 48 horas.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 4: CRESCIMENTO MICROBIANO

Crescimento microbiano

O termo crescimento microbiano refere-se ao aumento do número de células de determinado microrganismo. As bactérias, normalmente, se reproduzem por fissão binária (Figura 4.1).

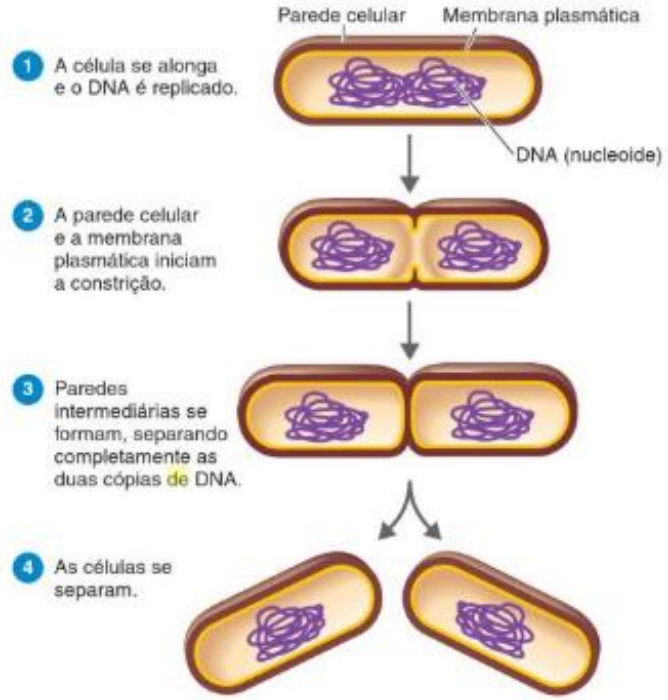


Figura 4.1. Diagrama da sequência de divisão celular.

O tempo necessário para uma célula se dividir é chamado de **tempo de geração** e varia consideravelmente entre os microrganismos e condições ambientais. O número de células em cada geração é expresso na potência 2 e o expoente reflete o número de duplicações (gerações) que ocorreram (Figura 4.2).

O número de bactérias dobra a geração. O número sobrescrito na potência de base 2 indica a geração, ou seja, $2^5 = 5$ gerações e 32 células

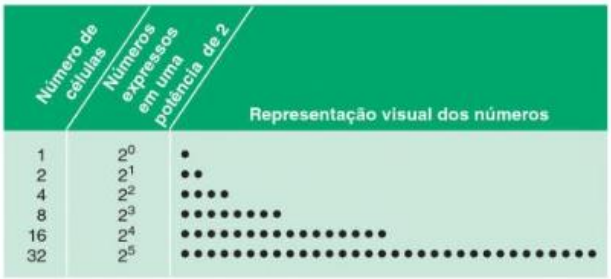


Figura 4.2. Representação visual do aumento do número de bactérias ao longo de cinco gerações.

Fases de crescimento microbiano

Quando algumas bactérias são inoculadas em meio líquido de crescimento e a população é contada em intervalos regulares, é possível representar graficamente a curva de crescimento bacteriano, que mostra o aumento do número de células em função do tempo (Figura 4.3). Há quatro fases básicas de crescimento: fase lag, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de morte celular.

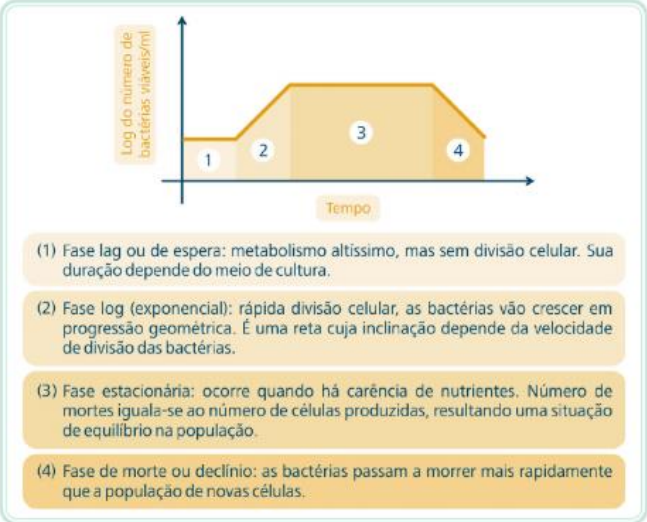


Figura 4.3. Curva de crescimento bacteriano.

Cálculo do tempo de geração (Tg) e velocidade específica de crescimento (µ)

O tempo necessário para uma célula se dividir (e a sua população dobrar) é chamado de **tempo de geração**. O tempo de geração e velocidade específica de crescimento podem ser calculados aplicando-se as seguintes equações:

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu m}$$

ou

$$\mu m = \frac{\ln 2}{tg}$$

Sendo, µm = velocidade específica de crescimento (h^{-1}) e Tg = tempo de geração (h).

Na Tabela 4.1, pode-se observar o tempo de geração de alguns microrganismos.

Tabela 4.1. Tempos de geração aproximado para alguns microrganismos crescendo em condições ótimas.

Espécie	Tempo de geração
Escherichia coli	20 min
Bacilus subtilis	28 min
Staphylococcus aureus	30 min
Pseudomonas aerujunusa	35 min
Thermus aquaticus	50 min
Rhodobacter spheaeroides	140 min
Sulfolobus acidicaldarius	4 horas
Thermoleophilum álbum	6 horas
Thermofilum pendens	10 horas
Mycobacterium tuberculosis	13 horas e 40 min

Medida do crescimento bacteriano

O crescimento de populações bacterianas pode ser medido de diversas maneiras. Alguns métodos medem o número de células, outros medem a massa total da população, a qual é frequentemente proporcional ao número de células. A quantificação de uma população normalmente é registrada como o número de células por milímetro de líquido ou grama de material sólido.

Os microrganismos podem ser quantificados de forma direta, por contagem do número de células microbianas em esfregaços oriundos de determinado material ou superfície, com auxílio de microscópio. Também podem ser quantificados indiretamente por meio de análises de turbidez, determinação da massa seca, concentração de substâncias químicas (proteínas, determinadas enzimas, produto final de uma via metabólica, DNA, RNA, etc). Outra forma de quantificação é por meio da contagem do número de microrganismos viáveis utilizando um meio de cultura apropriado.

- Massa seca – a massa seca das células microbianas é, normalmente, expressa em termos de sólidos suspensos (SS), uma vez que a biomassa microbiana, em crescimento disperso, é constituída de sólidos que se encontram em suspensão. No entanto, sólidos em suspensão representam materiais particulados menores que 2 µm (diâmetro de membrana de filtração), podendo ser constituído tanto de material orgânico, como de inorgânico. Assim, a biomassa é preferencialmente expressa em termos de sólidos suspensos voláteis (SSV), que representa principalmente a fração orgânica, eliminando a água e materiais inorgânicos por meio da combustão (oxidação). A determinação de sólidos suspensos totais (SST) e SSV é limitada a

quantidade máxima de sólidos secos de 200 mg, devido à possibilidade de formação de uma camada que dificulte a secagem. A determinação de SST e SSV é realizada por filtração em membrana (microfibra de vidro de 0,45-1,5 µm), que é previamente calcinada em forno mufla a 550ºC. Posteriormente, sua massa (em mg) é determinada em balança analítica e um volume conhecido (normalmente 50 ml) da amostra é passado em membrana usando um sistema de filtração a vácuo. A membrana é colocada em estufa a 105ºC por 24h e, novamente, a sua massa (em mg) é determinada. Assim, os SST pode ser determinado pela seguinte equação:

$$SST = \frac{(M2 - M1).1000}{V}$$

SST = sólidos suspensos totais (mg/L); M1= pesagem da membrana filtrante após mufla (mg); M2 = pesagem da membrana filtrante após estufa (mg); V = volume conhecido da amostra filtrado (ml).

Após a determinação de SST, é possível calcular SSV calcinando novamente a membrana em forno mufla a 550ºC por 15 min e determinando a nova massa da membrana filtrante:

$$SSV = \frac{(M2 - M3).1000}{V}$$

SSV = sólidos suspensos voláteis (mg/L); M3 = pesagem da membrana filtrante pós estufa (mg).

Os sólidos suspensos fixos (SSF), em mg/L, que são constituídos principalmente por materiais inorgânicos, podem ser determinados por:

$$SSF = \frac{(M3 - M1).1000}{V}$$

- Análise espectrofotométrica – a turbidez de uma cultura está relacionada com a concentração de células. Quanto mais turva a cultura, maior é a concentração celular. O método turbidimétrico mede a quantidade de luz transmitida no espectrofotômetro ajustado em diferentes comprimentos de onda, dependendo das propriedades ópticas dos diferentes meios ou suspensões microbianas. Quanto menor for a quantidade de luz transmitida (maior turbidez) maior é a concentração celular daquela suspensão.
- Análise molecular – algumas abordagens moleculares baseiam-se na quantificação de cópias de determinado segmento de DNA, regiões conservadas dos genomas, ou

genes intrínsecos em determinadas espécies. Sabendo-se da quantidade de cópias destes genes ou segmentos de DNA, pode-se utilizar o princípio da reação em cadeia da polimerase (técnica de PCR). A PCR permite medir a quantidade de DNA amplificado em um intervalo de tempo que pode ser comparado a padrões já estabelecidos, ou por reação de luz em abordagem chamada de PCR em tempo real. A amplificação de DNA é uma abordagem indireta que não permite inferências sobre a viabilidade celular em uma determina amostra.

Na pesquisa e indústria, o número de células e atividade microbiana são estimados por densidade óptica (*optical density*). A variação da densidade óptica (OD) em 600 nm em função do tempo para cultura de *Bacillus* sp. são apresentados na Figura 4.4.

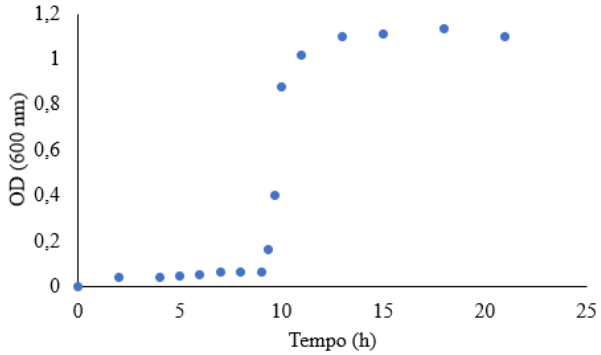


Figura 4.4. Relação densidade óptica com tempo.

Para que seja possível relacionar a medida indireta da densidade óptica em absorbância com a massa de microrganismos no meio, faz-se curva padrão conforme Figura 4.5.

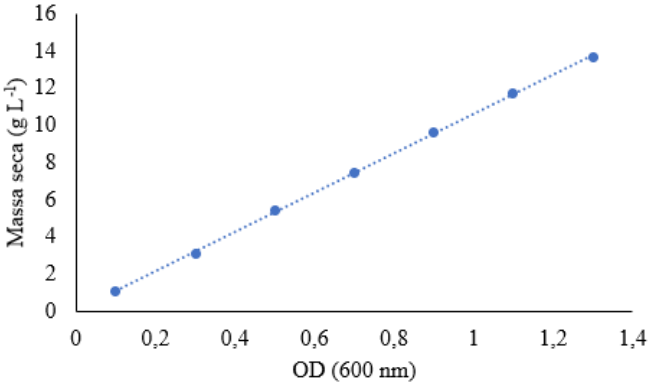


Figura 4.5. Relação massa seca e densidade óptica.

A determinação da velocidade específica na fase exponencial de crescimento pode ser feita graficamente. Neste método, linearizasse a fase exponencial da curva de crescimento, onde a velocidade específica é máxima e constante. Para isso calcula-se, por exemplo, o

logaritmo neperiano (ln) dos valores da concentração de microrganismos (ou absorbância) e projeta-se esses dados contra o tempo de cultivo. Após a linearização, faz se a regressão linear da curva. Por meio da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo possível calcular a equação da reta:

$$\mathbf{y = 2{,}6403x - 26{,}494} \qquad R^2 = 0{,}9986$$

A partir da equação da reta, o tempo de geração (Tg) e velocidade específica de crescimento (µm) podem ser estimados, sendo

µm = coeficiente angular da reta

$\mu m = 2{,}6403\ h^{-1}$

$Tg = \ln 2/\mu m$

$Tg = 0{,}26\ h$

Contudo, como pode ser observado na Figura 4.6, a proporcionalidade do gráfico de densidade óptica contra massa seca é mantida apenas dentro de certos limites. Assim, em altas concentrações celulares, a luz dispersa por uma célula e captada pela fotocélula do espectrofotômetro pode ser novamente dispersa por outra célula. Para a fotocélula, esse fenômeno pode causar impressão de que não houve dispersão da luz. Em densidades celulares tão elevadas, a correspondência entre o número de células e a densidade óptica afasta-se da linearidade e, portanto, as medidas da densidade óptica são menos precisas. Todavia, até esse limite, que varia para cada organismo, as medidas de densidade óptica podem corresponder a medida precisas do número de células ou do peso seco.

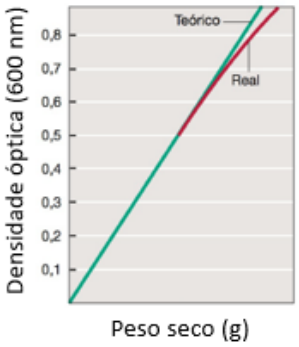


Figura 4.6. Relação turbidez com peso seco.

Portanto, neta aula prática, inicialmente será realizado a diluição seriada da amostra de crescimento microbiano, para posterior análise por absorbância.

Roteiro

1) Diluição decimal seriada

MATERIAL

- Suspensão bacteriana;
- Tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina esterilizada;
- Alça de transferência.

PROCEDIMENTO

- Marcar tubos contendo 9 ml de caldo nutriente (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6});
- Homogeneizar o tubo de cultura e, com pipeta estéril, transferir 1 ml (ou 8 alças) para o tubo marcado 10^{-1};
- Homogeneizar o conteúdo do tubo 10^{-1}, transferindo 1 ml (ou 8 alças) para o tubo marcado 10^{-2};
- Repetir este procedimento (diluições sucessivas) até o último tubo (Figura 4.7).

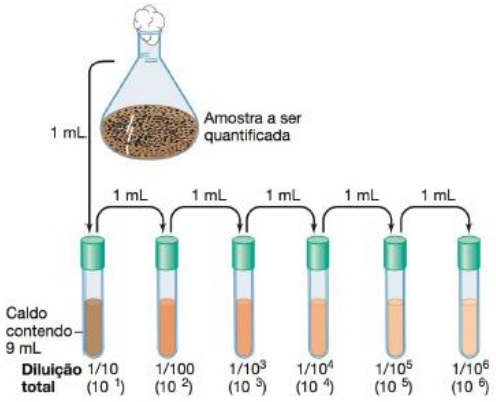


Figura 4.7. Diluição seriada.

- Realizar leitura no espectrofotômetro de cada diluição e relacionar o OD observado com a massa seca por meio da equação **y = 2,6403x - 26,494**.

Fator de diluição	OD (600 nm)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Livro Microbiologia de Brock, Michael Madigan, 12ª edição (capítulo 6).

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 5: TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

INTRODUÇÃO

A técnica do NMP pode ser usada para estimar o número de células viáveis na população. Alguns microrganismos não crescem bem em meio sólido ou são mais facilmente identificados pelo crescimento em meio líquido. É baseada na distribuição estatística dos microrganismos na suspensão. Quando amostras com volumes fixos são tomadas de uma suspensão celular, algumas podem ter mais células do que outras. Amostras repetidas da suspensão, contudo, produz número médio de organismos, definido como número mais provável.

A técnica do NMP ou da diluição, pode ser utilizada para estimar a população total ou enumerar grupos específicos de microrganismos presentes na amostra que são capazes de crescer em meio de cultura seletivo (Sakamoto, 1996). A estimativa da população total é considerada positiva se os tubos apresentarem turbidez e ou produção de gás. Nos grupos específicos de microrganismos pode-se considerar em particular um aspecto do metabolismo celular, ou seja, um indicador de ausência ou presença de crescimento.

O NMP é usado para enumeração de amostras coletadas de biodigestores, de aterros sanitários, entre outros. Períodos de incubação relativamente longos são requeridos devido ao lento crescimento das bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas, sendo 30 dias para condição mesofílica e 20 dias para a condição termofílica. Todavia, a contagem de bactérias desnitrificantes pode ser realizada após período de 7 a 14 de incubação, dependendo das concentrações de nitrato e fonte de carbono exógeno. É uma metodologia bastante simples, pois os tubos contendo meio de cultura líquido sob anaerobiose são inoculados quer pelo uso de pipetas ou seringas. Os resultados podem revelar o grupo bacteriano presente (microscopia), o consumo ou produção de determinada substância (cromatografia gasosa ou líquida), ou reação com indicador especifico que detecta presença ou ausência de determinado composto.

A técnica do NMP para bactérias desnitrificantes foi descrito por Tiedje (1982), adaptado para amostras líquidas, em relação ao tempo de incubação; uma vez que, esse

método foi desenvolvido para amostras de solo. A contagem das bactérias desnitrificantes é realizada por análise indireta referente à confirmação da presença de nitrato no meio de cultura em reação com adição de difenilamina ácida. O limite de detecção do nitrato por meio do método colorimétrico adotado para a contagem do NMP de bactérias desnitrificantes é de 30 mg/L.

OBJETIVO

Aplicar a técnica do número mais provável (NMP) para a quantificação de microrganismos a partir de amostras ambientais.

MATERIAIS

VIDRARIA E DEMAIS MATERIAIS

- Becker,
- Proveta,
- Pipetas de vidro,
- Peras plásticas,
- Pipeta automática com ponteira para 5 ml e 10 ml,
- Pissetas,
- Tubos de ensaio de 20 ml,
- Tampas para tubos de ensaio de algodão e gaze,
- Tubos de ensaio de 10 ml com tampas de borracha,
- Suporte para tubos de ensaio,
- Frasco de antibiótico com tampa de butila e lacre de alumínio,
- Pérolas de vidro,
- Seringas descartáveis com agulha de 1 ml e 5 ml,
- Caneta hidrográfica para vidro,
- Cápsulas para determinação de sólidos,
- Pipetas Pasteur,
- Tetinas,
- Tubos de ensaio pequenos,
- Papel branco.

REAGENTES

- Nitrato de sódio ($NaNO_3$) P. A.;
- Meio genérico (*Nutrient Broth*);
- Difenilamina $(C_6H_5)_2NH$);
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4);
- Hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4);

EQUIPAMENTOS

- Bico de Bunsen,
- Estufa com temperatura controlada,
- Autoclave,
- Mufla,
- Dessecador,
- Balança analítica,
- Micro-ondas.

PROCEDIMENTOS

AMOSTRA

A amostra deve ser representativa da população estudada. Geralmente a coleta deve ser efetuada no ponto de mistura completa, por exemplo, no caso de sistema de lodos ativados. Em amostras de provenientes de estação de tratamento de água residuária ou esgoto sanitário, a coleta é efetuada por amostrador com volume limitado e, posteriormente transferido para galão plástico de até 20L. Nesse caso o processo de coleta é repetido diversas vezes, garantindo a homogeneidade da amostragem.

O transporte da amostra é efetuado em galão plástico, com capacidade de 20L. O galão não deve ser preenchido totalmente. Essa medida é necessária para manter oxigênio suficiente à sobrevivência dos microrganismos durante o transporte e utilização da amostra. O galão deve ser fechado com rosca plástica; acondicionado no interior do veículo em pé, amarrado e transportado até o laboratório. No caso de amostra de lodos ativados, a amostra pode ser mantida sob refrigeração até o período de 7 dias e utilizada posteriormente. A estocagem sob refrigeração deve ser feita em frasco aberto, com a boca envolta em gaze.

TRATAMENTO DA AMOSTRA

Dependendo da origem da amostra se faz necessário tratamento adequado. Por exemplo, lodo floculento, proveniente de lodos ativados tem em sua constituição bactérias, fungos, protozoários e metazoários, além de partículas orgânicas e inorgânicas. As bactérias se agregam formando flocos, tornando-se necessário desfazê-los para desprender a biomassa e facilitar seu desenvolvimento. Agitação manual de frasco com pérolas de vidro é suficiente para desprender a biomassa a ser quantificada. Para tanto, coletar 200 ml de amostra do galão plástico e transferir para um becker. Esse volume será utilizado para análises de sólidos totais voláteis e para inoculação. Desse volume de 200 ml, coletar 10 ml e transferir para frasco de antibiótico (50 ml), contendo 5 g de pérolas de vidro.

Anteriormente, ao desprendimento celular o frasco com pérolas de vidro deverá ser autoclavado a 121^{o}C, 1 atm, durante 20 minutos. A seguir, fechar o frasco com tampa de butila e lacre de alumínio; sendo agitado manualmente em ângulo de 45^{o} por 20 minutos. Este procedimento será efetuado para permitir a desagregação dos flocos.

1. **2.**

Figura 5.1. Frascos para transporte (1) e estocagem (2) de amostra após coleta.

Reator UASB tem formação de lodo granulado e ocorre comumente em processos anaeróbios de tratamento de águas residuárias industriais. Os grânulos são estruturas densas formadas por agregados de microrganismos. Torna-se necessário desfazer os grânulos para desprender a biomassa. Nesse caso, o desprendimento da biomassa deve ser efetuado, conforme descrito a seguir. Aproximadamente, 200 ml de lodo granulado devem ser homogeneizados e desintegrados com auxílio de almofariz e pistilo, ou em liquidificador caseiro, durante 3 minutos. Posteriormente, 10 ml dessa amostra homogeneizada devem ser transferidas para frasco de antibiótico de 50 ml, contendo 5 g de pérolas de vidro, conforme descrito anteriormente.

PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Para a preparação da água de diluição é necessário preparar duas soluções estoque. Estas soluções estoque deverão ser esterilizadas em autoclave (1 atm, 121^{o}C, 20 minutos) e armazenadas em geladeira.

Tabela 5.1. Preparação de **s**oluções estoque.

Solução Estoque 1	**Quantidades – q.s.p. 100 ml de água ultrapurificada**
K_2HPO_4 (0,2 M)	3,48 g
Solução Estoque 2	**Quantidades – q.s.p. 100 ml de água ultrapurificada**
KH_2PO_4 (0,2 M)	2,72 g

Tabela 5.2. Preparação da água de diluição.

Água de diluição	**Quantidades – q.s.p. 250 ml de água ultrapurificada**
Solução estoque 1	1 ml
Solução estoque 2	0,25 ml

Adicionar 9,0 ml de água de diluição em tubos de ensaio. Efetuar esterilização dos tubos, tampados com algodão e gaze, em autoclave (1 atm, 121^{o}C, 20 minutos).

MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado será Meio genérico (*Nutrient Broth*), acrescido de nitrato na concentração de 500 mg/L, conforme descrito a seguir. Pesar os reagentes separadamente: 8,0 g de meio genérico e 0,685 g de $NaNO_3$. Adicionar água ultrapurificada previamente aquecida até completar o volume de 1000 ml. Usar balão volumétrico para medir o volume final. É necessário o aquecimento da água para que o meio genérico se dissolva completamente, conforme recomendações do fabricante. Efetuar a distribuição do meio de cultivo (4,5 ml) nos tubos de ensaio de 10 ml. Fechá-los com tampa de borracha. Efetuar esterilização dos tubos, em autoclave (1 atm, 121^{o}C, 20 minutos).

Observação: Os tubos vedados podem ser estocados à temperatura ambiente, no escuro até o momento da inoculação, após autoclavação.

INOCULAÇÃO

Sob ambiente de assepsia (próximo ao bico de Bunsen), efetuar as diluições necessárias, conforme ilustrado na abaixo.

Diluição da amostra em água fosfatada

Adicionar 1 ml de amostra previamente homogeneizada, sob ambiente de assepsia (bico de Bunsen), em tubo de ensaio com água de diluição (9 ml), obtendo-se a diluição 10^{-1}. Homogeneizar o tubo com diluição 10^{-1}. Retirar 1 ml e adicionar a outro tubo contendo água de diluição, obtendo-se assim a diluição 10^{-2}. Esse procedimento deverá ser efetuado até se obter todas as diluições desejadas.

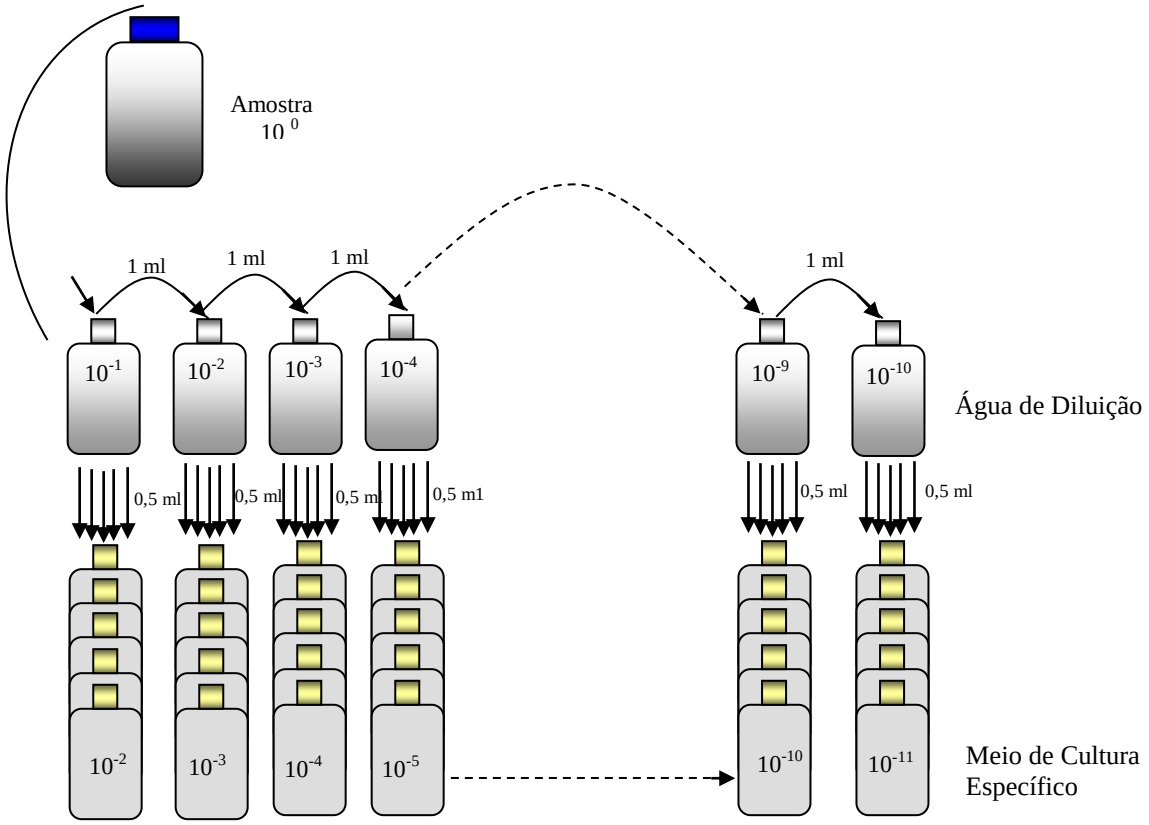


Figura 5.2. Esquema das diluições e inoculações para determinação do NMP.

Diluição da amostra em meio de cultivo

Para cada diluição em meio de cultivo devem ser usados 5 tubos de ensaio (quintuplicatas). Adicionar 0,5 ml do tubo de ensaio contendo amostra previamente homogeneizada em água de diluição (diluição 10^{-1}), sob ambiente de assepsia (bico de Bunsen), em cada tubo de ensaio contendo meio de cultivo, obtendo-se a diluição 10^{-2}. Esse procedimento deve ser realizado até obtenção do número de diluições desejada.

Tabela 5.3. Composição dos Tubos de ensaio inoculados para contagem do NMP.

Componentes	**Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultrapurificada**
Meio nutritivo	4,5 ml
Inóculo	0,5 ml
Volume Total	5,0 ml

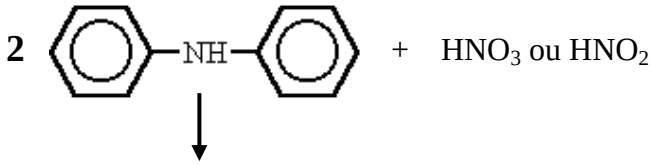
A adição do inóculo, nos tubos previamente autoclavados contendo meio de cultivo, devem ser efetuadas, com seringas estéreis. Nunca coletar volume maior do que aquele necessário para a diluição, visando não obter gradiente de biomassa na seringa. Além disso, como os tubos contendo meio de cultivo que foram autoclavados podem formar vácuos e, no momento na inoculação, todo o volume da seringa poderá ser sugado para o interior no tubo por diferença de pressão.

Geralmente se inicia a transferência do inóculo diluído em água fosfatada para o meio de cultivo a partir das menores diluições. Após a inoculação da quintuplicata referente a cada diluição, deve-se lavar a seringa com água destilada e proceder à próxima inoculação. Os tubos deverão ser vedados com tampa de borracha e acondicionados em estufa com temperatura controlada (37ºC).

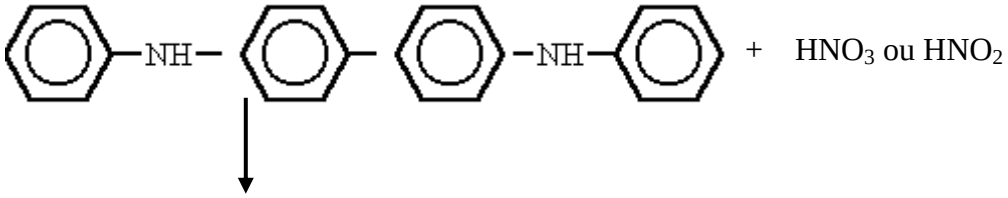
DETERMINAÇÃO DE NITRATO REMANESCENTE APÓS INCUBAÇÃO DO NMP

A determinação do nitrato é efetuada pela adição da solução de difenilamina ácida. A difenilamina oxidada transforma-se em difenilbenzidina e, posteriormente, em sal denominado quinoidiamonium de coloração azul.

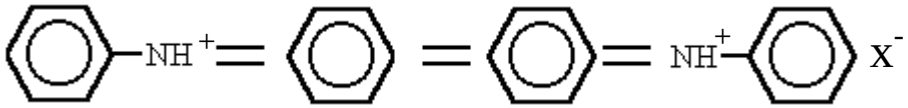
Difenilamina (incolor)



N,N difenilbenzidina (incolor)



Quinoidiamonium (azul)



(X = ânion Sulfato)

Figura 5.3. Reação para determinação de nitrato com adição de difenilamina ácida.

PREPARO DA SOLUÇÃO

Pesar 200 mg de difenilamina. Acrescentar ácido sulfúrico concentrado até completar o volume de 100 ml. Armazenar em frasco escuro tampado e sob refrigeração (4º C). Esse procedimento deve ser efetuado na capela, com luvas de borracha grossas. Testar os cinco tubos de ensaio de cada diluição (quintuplicatas), separadamente. Após período de incubação retirar uma alíquota dos tubos de ensaio e proceder à verificação do consumo de nitrato, conforme descrito a seguir.

Retirar 0,4 ml de cada tubo de ensaio, sob ambiente de assepsia (bico de bunsen), e transferir para um pequeno tubo de ensaio. A retirada da amostra a ser analisada deverá ser efetuada com auxílio de seringa e agulha estéril. Posteriormente, adicionar 2 a 3 gotas da solução ácida de difenilamina. A reação é muito rápida. O resultado positivo (+) indica consumo de nitrato e possível presença de bactérias desnitrificantes pela ausência de coloração. O resultado negativo (-) indica a presença de nitrato e, portanto, ausência de bactérias desnitrificantes pela coloração azul.

Tabela 5.4. Composição da Solução Teste para determinação de nitrato.

Sais e Regentes	**Quantidades – q.s.p. 100 ml de H_2SO_4 (concentrado)**
Difenilamina ($(C_6H_5)_2NH$)	200 mg

CONTAGEM

A contagem do NMP de bactérias desnitrificantes será feita com a combinação das respostas positivas (consumo de nitrato), utilizando a Tabela Padrão de Probabilidade, de acordo com APHA-AWWA-WEF (2005). A equação 1 mostra como deve ser feito cálculo do número de células obtido das diluições decimais por 100 ml, descrito a seguir:

$$\text{NMP/100 mL} = \frac{\text{Valor NMP (Tabela 8)}}{\text{Menor diluição da combinação de tubos positivos}} \times 10 \qquad (1)$$

Um exemplo de resultado obtido na técnica do NMP para utilização da Tabela Padrão de Probabilidade (APHA-AWWA-WEF, 2005), está descrito a seguir. Supondo que a combinação de respostas positivas tenha sido as seguintes: 3-2-2; para diluição respectivamente de 10^{-8}, 10^{-9}; 10^{-10}. Para essa combinação, o valor obtido na Tabela é 20. Os resultados podem ser apresentados em NMP100/ml ou NMP/g de STV.

Aplicando a fórmula:

$$\text{NMP/100 mL} = \frac{\text{Valor NMP (Tabela 8)}}{\text{Menor diluição da combinação de tubos positivos}} \times 10$$

$$\text{NMP/100 mL} = (20 \times 10)/10^{-8}$$

$$\text{NMP/100 mL} = 200 \times 10^{8} = 2 \times 10^{10}$$

Resultado Final: 2×10^{10} NMP/100 ml

Tabela 5.5. Índices do NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são utilizados 5 tubos de diluição.

Combinação de tubos positivos	**NMP/100 ml**	**Limite de confiança (95%)**		**Combinação de tubos positivos**	**NMP/100 ml**	**Limite de confiança (95%)**	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	< 1,8	-	6,8	4-1-1	21	6,8	42
0-0-1	1,8	0,090	6,8	4-1-2	26	9,8	42
0-1-0	1,8	0,090	6,9	4-1-3	31	10	70
0-1-1	3,6	0,70	10	4-2-0	22	6,8	50
0-2-0	3,7	0,70	10	4-2-1	26	9,8	70
0-2-1	5,5	1,8	15	4-2-2	32	10	70
0-3-0	5,6	1,8	15	4-2-3	38	14	100
1-0-0	2,0	0,10	10	4-3-0	27	9,9	70
1-0-1	4	0,70	10	4-3-1	33	10	70
1-0-2	6,0	1,8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8,1	3,4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6,1	1,8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8,2	3,4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8,3	3,4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3,5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10	3,5	22	5-0-0	23	6,8	70
2-0-0	4,5	0,79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6,8	1,8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9,1	3,4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6,8	1,8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9,2	3,4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4,1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9,3	3,4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4,1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5,9	36	5-2-1	70	22	170

cont. Índices do NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são utilizados 5 tubos de diluição.

2-3-1	14	5,9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5,9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7,8	2,1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3,5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5,6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3,5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5,6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6,0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5,7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6,8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6,8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6,8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6,8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9,8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6,8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9,8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9,8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4,1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5,9	36	5-5-5	>1600	700	-
4-0-2	21	6,8	40				
4-0-3	25	9,8	70				
4-1-0	17	6,0	40				

Fonte: APHA-AWWA-WEF (2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 6: ANÁLISE MICROSCÓPICA DE LODO (LODOS ATIVADOS)

INTRODUÇÃO

O floco do lodo ativado é constituído por fragmentos orgânicos não digeridos, por uma fração inorgânica (por exemplo, grãos de areia), por células mortas e, principalmente por uma grande variedade de bactérias dos gêneros: *Pseudomonas, Achomobacter, Flavobacterium, Citromonas, Zooglea*, além de bactérias filamentosas, tais como: *Nocardia sp, Sphaerotilus natans, Beggiatoa, Microthrix parvicella, Thiothrix*, etc (CETESB, 2018).

A estrutura do floco é subdividida em dois níveis: macroestrutura e microestrutura. A macroestrutura é formada por bactérias filamentosas, sendo considerada o esqueleto do floco. A microestrutura é a base do floco sendo composta de agregados de células. Apesar das bactérias filamentosas terem grande importância na estrutura do floco, seu crescimento deve ser limitado. Quando ocorrem em excesso não permitem a sedimentação do lodo no decantador secundário, resultando num fenômeno conhecido como intumescimento filamentoso do lodo ou *bulking*. Quando ocorrem em pouca quantidade, observa-se também má sedimentação do lodo devido à formação de flocos pequenos conhecidos como *pin-poin* (CETESB, 2018).

Para o bom desempenho de um sistema de lodos ativados é fundamental que a separação entre o lodo e a fase líquida, que ocorre no decantador secundário, seja rápida e eficiente. Os lodos mais frequentemente encontrados em sistemas de lodos ativados podem ser classificados como:

- **Lodos onde predominam flocos com características adequadas:** São caracterizados pela presença de bactérias formadoras de flocos (microestrutura) e bactérias filamentosas (macroestrutura) em equilíbrio, propiciando a formação de flocos grandes e com boa resistência mecânica;

- **Lodos onde predominam flocos com características inadequadas:** São caracterizados pela presença excessiva ou pela ausência de macroestrutura (filamentos). No primeiro caso, há excesso de bactérias filamentosas que ultrapassam os limites dos flocos, prejudicando as características de sedimentação e compactação, levando ao intumescimento do lodo (*bulking* filamentoso); no segundo caso, não há quantidade suficiente de bactérias filamentosas formando a

macroestrutura dos flocos, resultado em flocos com dimensões muito pequenas que ficam dispersos na fase líquida (*pin-point*) ver Fig. 1.

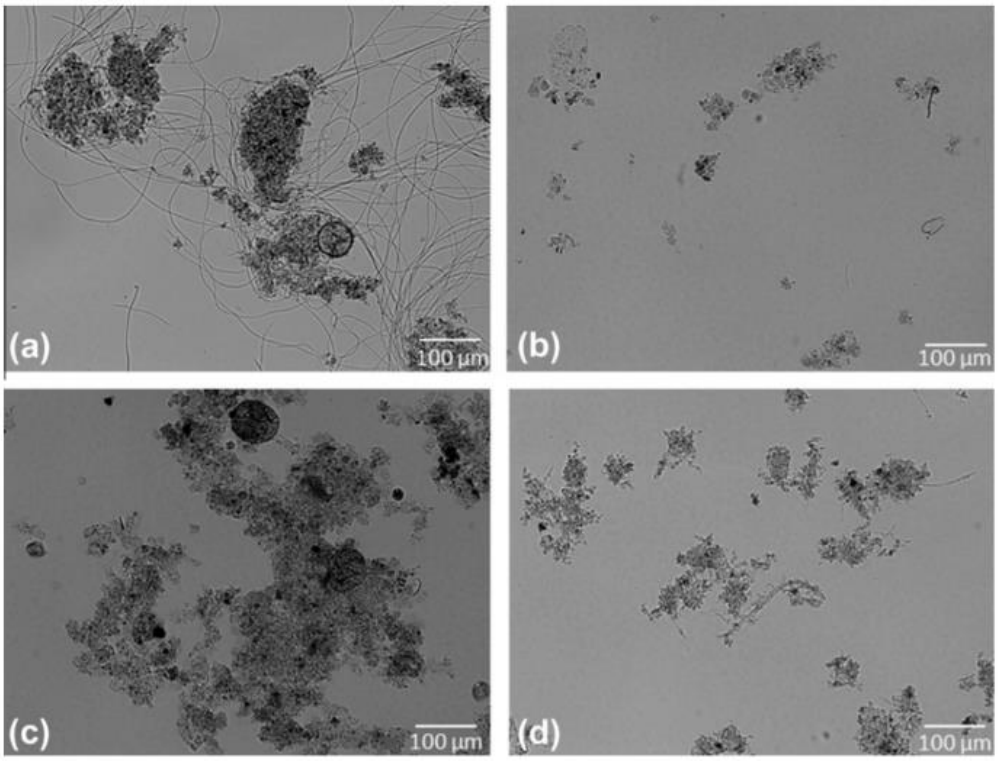


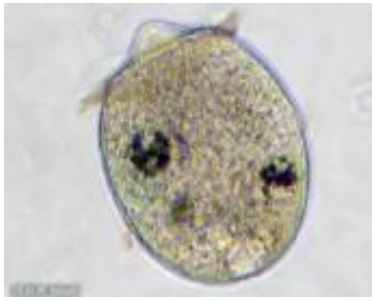
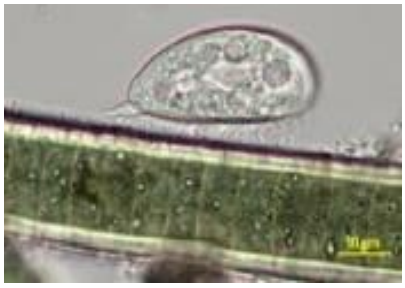
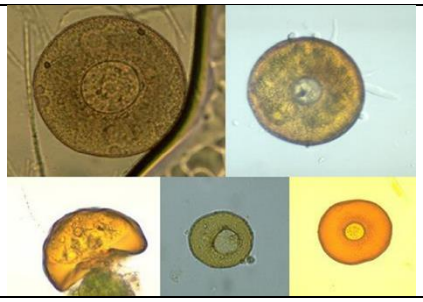
Figura 6.1. (a) Bulking filamentoso, (b) Flocos pin point flocs, (c) Bulking zoogleal (d) Flocos normais (Fonte: Mesquita *et al.*, 2011).

O sistema de lodos ativados possui uma população de microrganismos característica, composta frequentemente por bactérias, fungos, algas, protozoários e micrometazoários.

- **Bactérias:** microrganismos unicelulares que se apresentam isoladas ou em cadeia e cuja forma varia de esférica a bastonetes ou espiraladas. Seu tamanho normalmente não excede 1,5 micrômetros de comprimento. Quando se agrupam formando filamentos, estes podem atingir centenas de micrômetros. Um exemplo de bactéria não filamentosa de grande importância é a *Zooglea ramigera*, devido a sua capacidade de formar uma cápsula amorfa de muco que envolve suas células. O crescimento excessivo dessa bactéria leva à formação de flocos volumosos e de consistência gelatinosa que sedimentam mal. Esse fenômeno é conhecido como intumescimento não filamentoso do lodo ou ***zoogleal bulking***;

- **Fungos:** os fungos são habitantes frequentes em lodos ativados. Seu desenvolvimento pode ser estimulado quando prevalecem determinadas condições nos tanques de aeração, tais como: pH baixo (em torno de 5), presença de grande quantidade de carboidratos e deficiência de nutrientes. Os fungos são tão eficientes quanto as bactérias na estabilização da matéria orgânica, mas por serem filamentosos, podem ser levar o sistema ao *bulking* quando presentes em grande número. Dentre os gêneros que podem aparecer em lodos ativados podemos citar: *Geotrichum, Fusarum, Penicillum, Cladospirum*;
- **Algas:** embora não seja o ambiente propício para o seu crescimento devido à ausência de luz provocada pela turbidez do meio, algumas algas podem estar presentes em sistemas de lodos ativados. Apesar de desempenhar um papel significante em lagoas de estabilização, pouco se sabe da sua contribuição em processos de lodos ativados. Muitas vezes sua presença está associada a uma diminuição na quantidade de sólidos no meio ou à existência de um pré-tratamento do qual se desprendeu. As algas presentes em esgotos são as mesmas que comumente habitam águas poluídas;
- **Protozoários:** são microrganismos unicelulares, microscópicos, com tamanho variando de 5 a 5.000 micrômetros, embora a maioria das espécies apresente de 30 a 300 micrômetros de comprimento. Algumas espécies formam colônias, sendo suas células fundamentalmente independentes e similares na estrutura e função. A forma das células é bastante variável, sendo as mais comuns: e esférica, a oval, a alongada ou achatada. São tipicamente translúcidos (transparentes), mas algumas espécies podem apresentar coloração devido à ingestão de alimento, material de reserva ou pigmentos (clorofila). Alimentam-se de bactérias, outros protozoários e de matéria orgânica dissolvida e particulada. Os protozoários podem ser subdivididos em grupos de acordo com o tipo de organela utilizada para a locomoção e captura de alimentos em: Ciliados (livre natantes; predadores de flocos e fixos ou pendunculados); Flagelados; Amebas (rizópodes) ver Figura 6.2;

- **Micrometazoários:** são microrganismos formados por várias células que, agrupadas formam verdadeiros tecidos. Células diferentes possuem funções diferentes. No processo de lodos ativados são representados por Anelídeos, Rotíferos, Nematóides e Tardígrados (ver Figura 6.3).

A			
B			
C			
D			

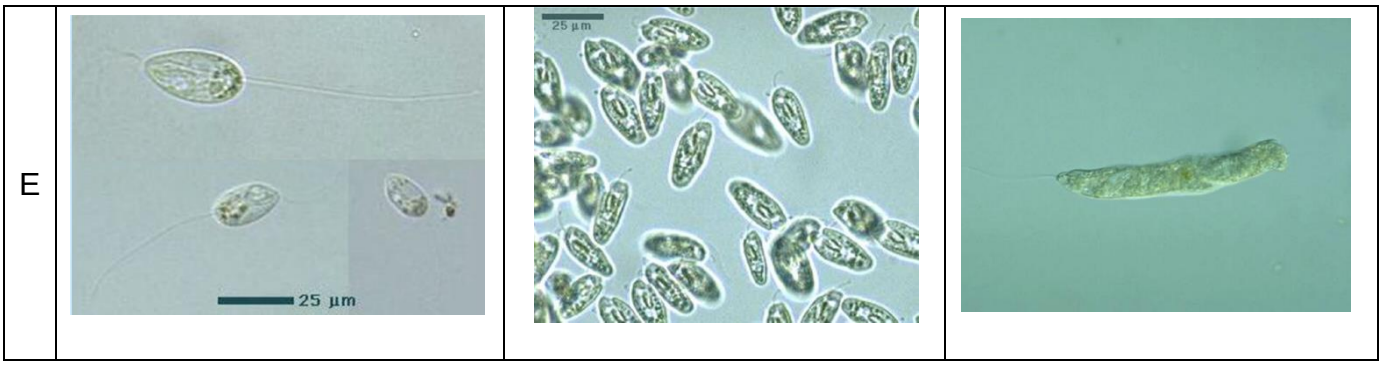
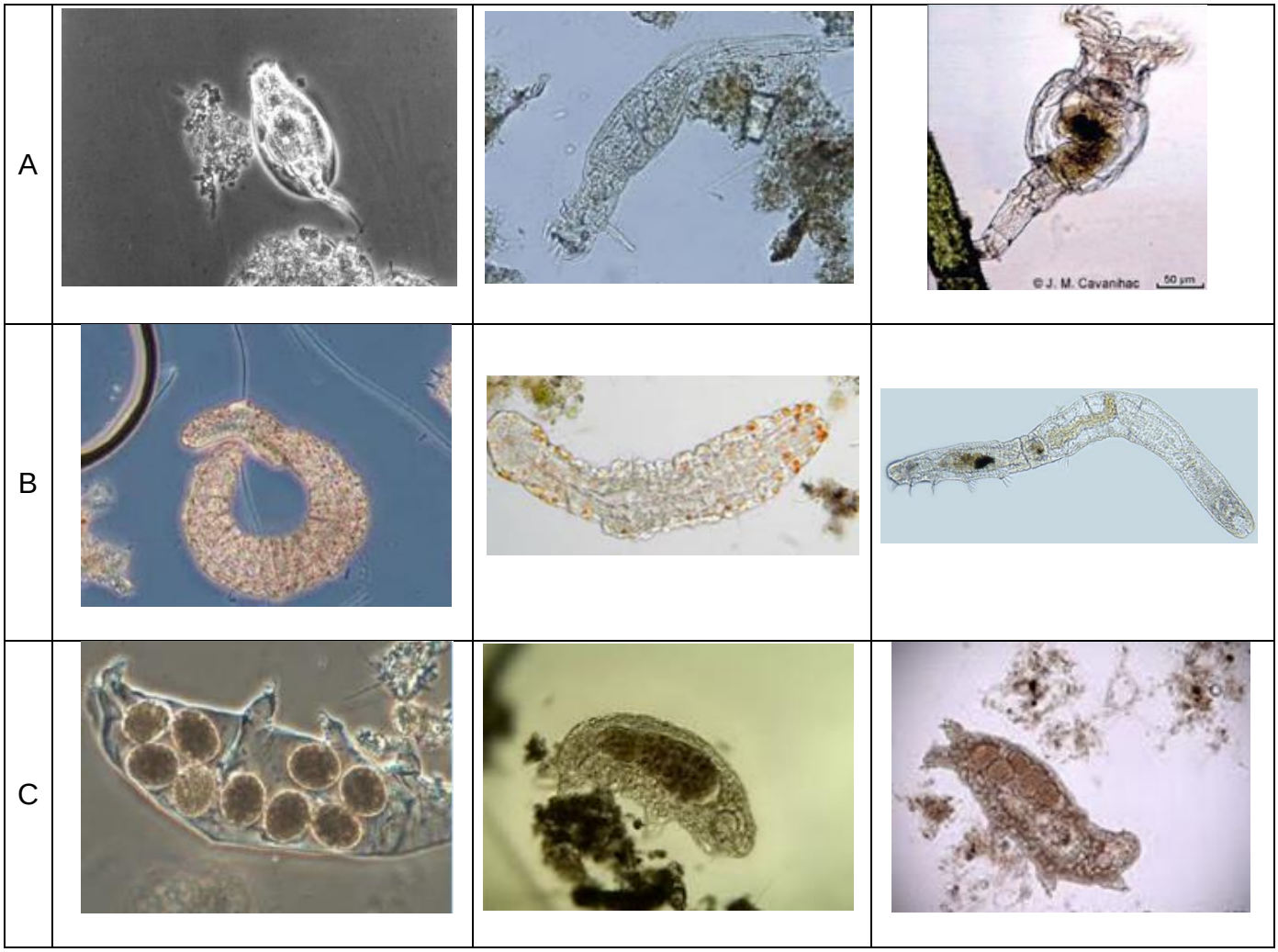


Figura 6.2. Protozoários: (A) Ciliados livre-natantes, (B) Ciliados predadores de flocos, (C) Ciliados fixos ou pendunculados, (D) Rizópodes (amebas), (E) Flagelados (Fonte: CETESB, 2018).



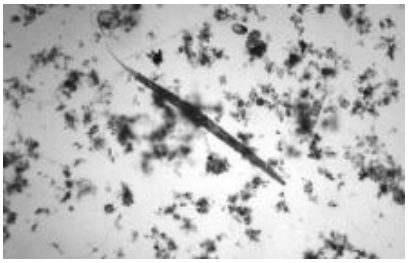
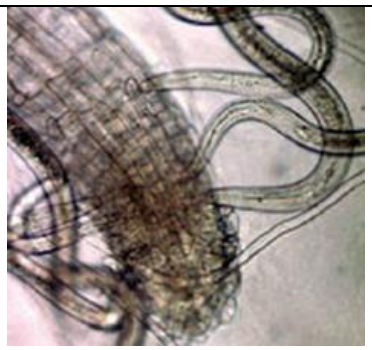
D			

Figura 6.3. Micrometazoários: (A)Rotíferos, (B) Anelídeos, (C) Tardígrados, (D) Nematóides (Fonte: CETESB, 2018).

Os flocos de lodos ativados são o centro de todo o processo. Muitos problemas operacionais são causados diretamente pelo fato destes flocos não possuírem uma boa qualidade. O conhecimento da qualidade do floco é, portanto, indispensável para permitir uma correta interpretação do desempenho do processo de tratamento, e realizar alterações quando necessárias. De acordo com Eikelboom (2000), caracteriza os flocos quanto aos seguintes aspectos:

- **Forma – arredondados/irregulares**: os flocos completamente redondos são muito raros em lodos ativados. Consequentemente, flocos que apresentam um formato mais ou menos esférico serão considerados arredondados. Quando a forma diferir muito da globular podemos classifica-los como irregulares. Neste caso, o floco se apresenta com várias projeções (pontas) emergindo para diferentes lados. A presença de um maior número de bactérias filamentosas e o aumento de carga na estação normalmente resultam em flocos irregulares.
- **Resistência – firme/fraco:** esta é uma característica de difícil descrição. Em um floco fraco a coesão entre as células bacterianas é muito baixa, não existindo uma região central firme no interior do floco. A estrutura do floco pode ser facilmente destruída através de uma leve pressão na lamínula. O limite entre o floco e líquido circundante não é bem definido, pois nos bordos do floco existe uma série de células que não sabemos se pertencem ao floco ou são simplesmente células bacterianas dispersas. Quando os flocos fracos estão presentes, muitas células bacterianas dispersas são evidentes. A resistência do floco está muito associada com a carga da estação de tratamento. Quando uma carga muito baixa é aplicada (< 0,025 g DBO x g^{-1} SSV x d^{-1}), o floco apresenta a tendência de se

desintegrar em pequenas partículas, pois não existem nutrientes disponíveis para manter as bactérias formadoras de flocos vivas. Em cargas altas (> 0,4 – 0,6 g DBO x g^{-1} SSV x d^{-1}) frequentemente encontramos flocos fracos de onde podemos separar facilmente pequenas partículas. Nesta faixa de carga, as bactérias estão menos inclinadas a formar flocos. Na faixa intermediária de carga formam-se principalmente os flocos firmes.

- **Estrutura – compacto/aberto:** um floco compacto é aquele em que não se encontram espaços abertos no interior. Em um floco aberto, ao contrário, partes do floco são claramente separadas das outras por estes espaços. A estrutura aberta do floco pode ser causada pela presença de microrganismos filamentosos.

  A forma dos flocos influencia a taxa de sedimentação do lodo no decantador secundário. Sob o ponto de vista da sedimentação, são preferíveis flocos arredondados e compactos, mas nem sempre este floco é o ideal. A matéria em suspensão presente no efluente consiste principalmente de pequenos flocos que não sedimentam suficientemente rápido. No entanto, a maioria destes flocos acaba sedimentando devido ao arraste propiciado pelos flocos maiores. Este arraste é mais eficiente quando estes flocos maiores não são tão arredondados.

- **Dimensão - pequenos/médios/grandes:** o tamanho dos flocos é dependente da carga da estação de tratamento, da qualidade do esgoto e da turbulência no tanque de aeração. Com o auxílio de uma ocular dotada de retículo, a medida aproximada do diâmetro do floco pode ser rapidamente determinada. Este diâmetro é obtido através da medida tomada entre os dois pontos mais distantes do floco, não levando em consideração os microrganismos filamentosos que se projetam dele, podendo ser reunidos em três grupos distintos:
  - **Grandes**: cujo diâmetro é maior que 500 µm;
  - **Médios**: cujo diâmetro está entre 150 e 500 µm;
  - **Pequenos**: cujo diâmetro é menor que 150 µm.

Flocos muito pequenos geralmente causam turbidez no efluente, devido à baixa capacidade de sedimentação. Estes flocos podem estar relacionados com cargas muito baixas, muita turbulência no tanque de aeração, substâncias tóxicas e a presença de grandes concentrações de compostos complexos, difíceis de serem degradados.

Jenkins *et al.,* (1986) *apud* Jenkins *et al.,* (2003), propuseram um índice qualitativo para flocos de lodos ativados. A metodologia baseia-se na observação dos flocos da amostra concomitantemente com a avaliação da abundância de filamentos presentes para atribuição a uma das 7 (sete) categorias propostas que vão de 0 (ausência) a 7 (excesso), conforme Quadro 1.1. Sendo as categorias 0, 1 e 2 consideradas pouca quantidade; 3 e 4 densidade ideal e 5 e 6 quantidades excessivas de filamentos e portanto prejudiciais ao processo (ver Figura 6.4).

Quadro 1.1. Escore Subjetivo de Abundância de Filamentos.

Classe	Abundância	Descrição
0	Nenhum	Completa ausência dos filamentos
1	Poucos	Filamentos observados só em alguns flocos ocasionalmente
2	Alguns	Filamentos presentes, mas não em todos os flocos
3	Moderado	Filamentos observados em todos os flocos, mas com baixa densidade (1 a 5 filamentos por floco)
4	Frequente	Filamentos observados em todos os flocos, com média densidade (5 a 20 filamentos por floco)
5	Abundante	Filamentos observados em todos os flocos, com alta densidade (no mínimo 20 filamentos por floco)
6	Excessivo	Filamentos presentes em todos os flocos, existem mais filamentos que flocos, os flocos invadem quase completamente o espaço entre flocos

Fonte: JENKINS, 1986 *apud* ABREU, 2004.

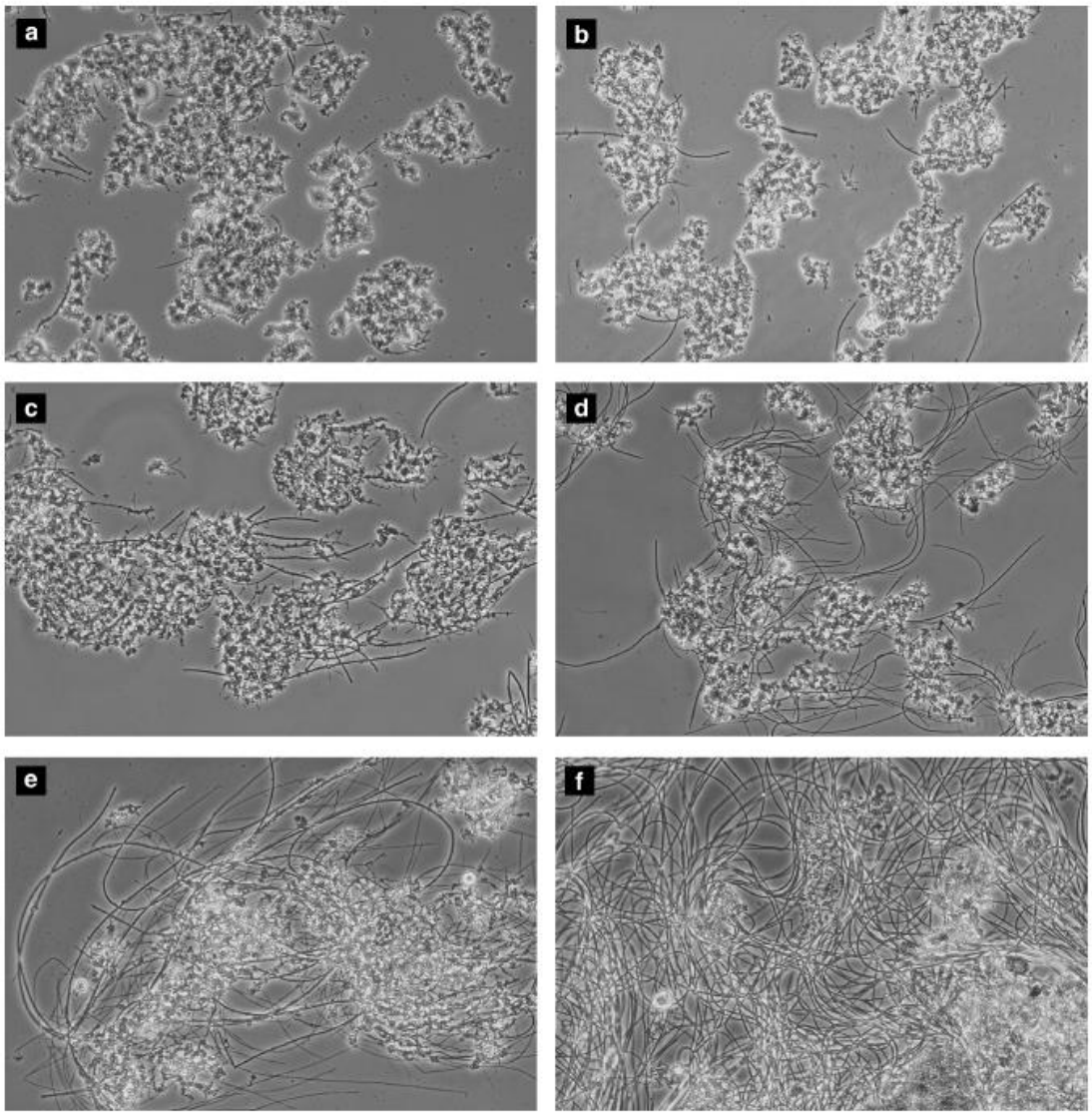


Figura 6.4. Fotomicrografias em contraste de fase das categorias de abundancia relativa de filamentos para o escore subjetivo proposto por Jenkins *et al.*, (1986): (a) poucos, (b) alguns, (c) moderado, (d) frequente, (e) abundante, (f) excessivo (Aumento de 100x). (Fonte: Jenkins *et al.*, 2003).

A análise qualitativa é suficiente para avaliar o desempenho do processo, porém recomenda-se que seja realizada diariamente, ou pelo menos três vezes por semana nos sistemas de tratamento.

OBJETIVO

Realizar a caracterização do(s) grupo(s) predominantes da microbiota e a avaliação qualitativa de flocos de lodo proveniente de amostra de tanque de aeração de sistema de lodos ativados, correlacionando estes aspectos com a performance do sistema.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preservação da amostra

A amostra a ser observada ao microscópio tem que ser a mais representativa possível. Para tanto, recomenda-se coletá-la próximo à saída do tanque de aeração, antes da entrada no decantador. A análise microbiológica deve ser realizada imediatamente após a coleta, para evitar alterações da microfauna. Quando for necessária a preservação, deve-se manter a amostra a temperatura de 4ºC, não devendo ultrapassar três dias de estocagem. O congelamento não é aconselhável, pois destrói os flocos. O frasco de coleta deve ser preenchido somente pela metade de modo a manter oxigênio em sua parte superior. Conservantes químicos não devem ser utilizados, pois a análise é feita com material vivo.

PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Material e equipamentos necessários

- Lâminas para microscopia;
- Lamínulas;
- Pipeta *Pasteur*;
- Microscópio óptico.

Metodologia para análise qualitativa

A amostra coletada deve ser previamente homogeneizada antes da análise. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, pinga-se de uma a duas gotas da amostra de lodo ativado em lâmina para microscopia, cobrindo-a posteriormente com lamínula, tomando o cuidado para não formar bolhas. Caso necessário, realizar a diluição da amostra.

A análise é realizada em microscópio óptico com aumento de 100 a 200 vezes, e será subdivida em duas partes: 1. Análise qualitativa dos grupos de microrganismos presentes; 2. Análise dos flocos.

1. Análise qualitativa dos microrganismos:

Na análise qualitativa serão observados os seguintes aspectos:

- a presença de microrganismos (bactérias, protozoários e micrometazoários) no líquido proveniente do tanque de aeração;
- se estão vivos ou não;
- se apresentam comportamento habitual;
- quais gêneros e respectivos grupos estão representados;

- se existe predominância de determinado grupo ou gênero sobre os demais componentes da comunidade do lodo.

2. **Análise qualitativa dos flocos:**
   - Na lâmina preparada anteriormente, observar e descrever as características predominantes dos flocos:
     - ✓ Forma;
     - ✓ Resistência;
     - ✓ Estrutura;
     - ✓ Dimensão.
   - Realizar a contagem do número de filamentos que se projetam dos flocos, para aplicação do índice de Jenkins (1986), para o enquadramento da amostra nas categorias de 0 a 7 conforme descrito no Quadro 1.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. A. V. **Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização *in-situ* de Fluorescência (FISH).** Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho. 2004. 142p.

CETESB. Apostila do TPE – **Microbiologia de lodos ativados**, 2018.

EIKELBOOM, D. H. **Process control of activated sludge by microscopic investigation. London**. IWA Publishing, London, England, 2000.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G. & DAIGGER, G. T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**. 3rd edition, 2003.

MESQUITA, D.P.; AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. **Identifying different types of bulking in an activated sludge system through quantitative image analysis**. Chemosphere 85 (2011) 643-652. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.012

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 7: DETERMINAÇÃO DA RESPIRAÇÃO BASAL DO SOLO

INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana do solo é definida como a porção viva da matéria orgânica, excluindo as raízes de plantas e macrorganismos maiores do que 5 x 10^{-3} µm. Do total de matéria orgânica do solo, a biomassa microbiana representa cerca de 2% (Jenkinson; Ladd, 1981) e sua concentração varia à medida que aumenta a profundidade, apresentando os maiores valores no horizonte até 20 cm (Starc, 1947 apud Moreira; Siqueira, 2006; Moura et al., 2015).

A decomposição dos diversos constituintes da matéria orgânica ocorre de forma variável em diferentes estágios e populações de microrganismos (Kiehl, 1985). A biomassa microbiana do solo reflete as modificações ocorridas devido à adição de resíduos orgânicos (Dornelles, et al., 2017), manejo do solo, adição de poluentes, efeito de queimadas e índices pluviométricos, por isso pode ser utilizada para avaliar a qualidade do solo (Moreira; Siqueira, 2006).

A biomassa microbiana é a massa total de microrganismos em um determinado volume de solo, é composta principalmente por fungos e bactérias que são os responsáveis por quase toda a atividade biológica neste meio (Moreira; Siqueira, 2006). A respiração basal do solo é medida pela quantidade de CO2 produzido pela biomassa microbiana, é um indicador da atividade biológica amplamente utilizado, pois reflete os processos de catabolismo dos organismos aeróbios, decomposição da matéria orgânica, disponibilização e imobilização dos nutrientes no solo (Parkin; Doran; Franco - Vizcaíno, 1996).

Como a microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos compostos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia do solo, a biomassa microbiana e sua atividade têm sido apontadas como as características mais sensíveis às alterações na qualidade do solo, causadas por mudanças de uso e práticas de manejo, como as promovidas pela aplicação de resíduos orgânicos (Debosz et al., 2002).

OBJETIVOS

Avaliar a emissão de CO2 pela biomassa microbiana do solo coletado em diferentes condições de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Será utilizado a método aperfeiçoada por Silva; Azevedo e De-Polli (2007). As unidades experimentais serão constituídas de recipientes de vidro com tampa hermética.

Serão utilizados 50 g de solo seco por recipiente, incubados a temperatura de 25º C. Para os tratamentos controle serão utilizados frascos sem solo. Em cada frasco de vidro será adicionado copinhos descartáveis contendo 10 ml de NaOH a 1 M para captura do CO_2 gerado.

Passado o período de incubação, será adicionado 2 ml de $BaCl_2$ 10% ao copinho descartável imediatamente após abertura do frasco hermético para finalizar a reação de captura do CO_2, 3 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador e titulado com solução de ácido clorídrico a 0,5 M.

Material, equipamentos e reagentes necessários

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg;
- Capela de exaustão para vapores ácidos;
- Balão volumétrico 100 e 1000 ml;
- Beckers de 100 e 1000 ml;
- Pipeta automática de 10 ml, com precisão de 0,01;
- Frascos de vidro com tampa de fechamento hermético;
- Agitador magnético;
- Erlenmeyer 125 ml;
- Bureta ou titulador automático com precisão de 0,01 ml;
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M: pesar rapidamente 39,9971 g de hidróxido de sódio, pois o mesmo é altamente higroscópico. Transferir para um Becker de 1000 ml, adicionar 700 ml de água deionizada cuidadosamente. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 ml aferindo o volume com água deionizada após o resfriamento;
- Solução de cloreto de bário ($BaCl_2$) 10% (m/v): pesar 10,000 g de cloreto de bário, transferir para um Becker de 100 ml e adicionar 60 ml de água deionizada. Dissolver o sal por completo e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml aferindo o volume com água deionizada;

- Fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$) 1% (m/v) em etanol: pesar 1,000 g de fenolftaleína e transferir para um Becker de 100 ml. Adicionar 50 ml de etanol (C_2H_5OH) P.A.; dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e aferir o volume a 100 ml com o mesmo álcool;
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M: pipetar 41,40 ml de ácido clorídrico P.A. 37%, em capela de exaustão, em um Becker de 1000 ml contendo 500 ml de água deionizada. Homogeneizar a solução no Becker e, após esfriar, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 ml, aferindo o valor com água deionizada

PREPARO DA AMOSTRA

Na área escolhida para coleta deve ser feita uma limpeza superficial, retirando restos de folhas e vegetação e deixando exposto o solo. As amostras de solo devem ser coletadas até profundidade máxima de 3 cm. Deve ser retirada de forma manual qualquer fragmento de animais ou vegetais por meio de catação.

PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Pesar 50 g de solo em frascos de vidro de 100 ml. Adicionar 10 ml de NaOH 1 M em copinho descartável e colocar imediatamente dentro do frasco de vidro com auxílio de uma pinça. Fechar o frasco de vidro com o solo imediatamente após o posicionamento do copinho descartável (com 10 ml de NaOH).

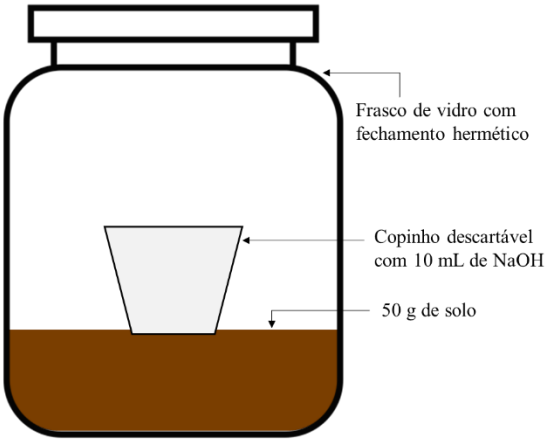


Figura 7.1. Desenho do frasco para incubação contendo amostra de solo e recipiente com NaOH para captura do CO_2.

Após realizar todo o preparo para a incubação deve-se anotar a hora e a data de quando se iniciou a incubação, para que seja calculada através destes dados a respiração

basal do solo. Os frascos devem ser mantidos em local isento de luminosidade e com temperatura em torno de 25 a 28ºC durante um período que pode variar de 5 a 10 dias.

QUANTIFICAÇÃO DO CO_2 RESPIRADO

Após o processo de incubação, imediatamente após abertura do frasco de vidro adicionar 2 ml de $BaCl_2$ 10% (m/v) no copinho descartável para a completa precipitação do CO_2. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína 1% (m/v) e titular sob agitação magnética com solução 0,5 M de ácido clorídrico. Ao final da titulação a coloração da solução irá de rosa (A) à branco (B).

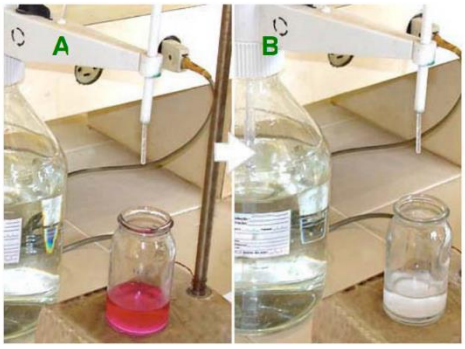


Figura 7.2. Ponto estequiométrico da volumetria de neutralização ácido-base.

A respiração basal do solo pode então ser calculada pela equação 1:

$$RBS\ (mg\ CO_2.kg^{-1}\ solo.hora^{-1}) = \frac{\left(\frac{(Vb - Va).M.6.1000}{Ps}\right)}{T} \qquad (1)$$

Onde:

RBS= carbono oriundo da respiração basal do solo;

Vb= volume de ácido clorídrico gasto na titulação da solução controle (branco) (ml);

Va= volume gasto na titulação da amostra (ml);

M= molaridade do ácido clorídrico (HCl);

Ps= Massa de solo (g);

T= tempo de incubação da amostra (h).

REFERÊNCIAS

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. **Microbial biomass in soil. Measurement and turnover**. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. (Ed.). Soil biochemistry. New York, Dekker, p. 415-471.1981.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2006, 744 p.

MOURA, J. A. et al. **Respiração basal e relação de estratificação em solo cultivado com citros e tratado com resíduos orgânicos no estado de Sergipe.** Revista Semina: Ciências Agrárias. Londrina - PR, v. 36, n. 2, p. 731-746, 2015.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba, Editora Agronômica Ceres Ltda, 1985. 492p.

PARKIN, T.; DORAN, J.; FRANCO - VIZCAÍNO, E. **Field and laboratory test of soil respiration.** In: Doran; J., Jones A. (Eds.); Methods for Assessing Soil Quality. Soil Science Society of America. New York, p. 231 - 246, 1996.

DEBOSZ, K.; PETERSEN, S.O.; KURE, L.K. & AMBUS, P. **Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties.** Appl. Soil Ecol., 19:237-248, 2002.

DORNELLES, H., MATSUOKA, M., BINELO, L., PAUVELS, L., CARON, C., & SILVA, V. (2017). **Biomassa e atividade microbiana de solos com aplicação de resíduo sólido urbano e dejeto líquido de suínos.** *Revista Brasileira De Ciências Ambientais (Online)*, (44), 18-26. https://doi.org/10.5327/Z2176-947820170046

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S. de; DE-POLLI, H. **Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO2).** EMBRAPA - Comunicado técnico 99. Seropédica, Rio de Janeiro 4 p. 2007a.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 8: METABOLISMO MICROBIANO E PROVAS BIOQUÍMICAS

INTRODUÇÃO

As colorações simples, diferenciais ou estruturais, mesmo se combinadas com diferentes tipos de cultivo e observação das características das colônias, não são, muitas das vezes, suficientes para a identificação de bactérias isoladas. Desta forma, devemos lançar mão de outras técnicas ou metodologias que, combinadas com as outras características, possibilitem determinar com precisão qual a bactéria com que se está trabalhando e/ou pesquisando.

Os testes bioquímicos (também conhecidos como provas bioquímicas) são amplamente utilizados em associação com os resultados obtidos através da coloração e cultivos, servindo como prova definitiva na identificação das bactérias isoladas, visto que as propriedades metabólicas são únicas para cada espécie. Esta classificação das bactérias em relação às suas características bioquímicas se dá porque os microrganismos apresentam diferentes vias metabólicas para obtenção de energia (fermentação, respiração aeróbia ou ambos), bem como podem possuir enzimas específicas utilizadas no processo de metabolização dos diferentes substratos contidos nos meios de cultivo. Mesmo bactérias com alto padrão de similaridade podem ser caracterizadas e isoladas por testes bioquímicos que avaliam a presença ou ausência de enzimas envolvidas nos processos catabólicos.

Os testes bioquímicos para identificação dos microrganismos podem ser divididos em dois grupos principais: **tipo de metabolismo e atividade enzimática**. Dentre os principais testes realizados para identificação bioquímica de bactérias, podem ser citados: fermentação de carboidratos, teste do vermelho de metila (VM), hidrólise do amido, produção de indol, entre outros.

Após a análise de todos os testes bioquímicos, expressados na maioria das vezes como positivo ou negativo, os resultados poderão ser agrupados e a bactéria identificada de acordo com as suas características já pré-estabelecidas através de esquemas de identificação.

OBJETIVO

Identificar os testes bioquímicos que permitem a classificação de bactérias e sua relação com o metabolismo microbiano.

1. Fermentação de carboidratos

A fermentação é um processo metabólico no qual o aceptor final de elétrons é uma molécula orgânica. A fermentação da glicose começa tipicamente com a produção de ácido pirúvico pela via glicolítica. Algumas bactérias podem usar a via alternativa das pentoses ou a via de Entner-Doudoroff, entretanto, em ambas as vias ocorre também a produção de ácido pirúvico. Vários produtos finais da fermentação podem ser produzidos a partir do ácido pirúvico, incluindo variedade de ácidos, gases, tais como, H_2 ou CO_2 e álcoois, sendo que os produtos finais dependem exatamente do organismo e substrato fermentado.

As **bactérias entéricas (*E. coli, Enterobacter, Shigella, Salmonella, Klebsiella, Proteus, Citrobacter,* etc.)** são caracterizadas por bacilos Gram-negativos, não formadores de endósporos, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia, aeróbios facultativos, oxidase negativos, com exigências nutricionais relativamente simples, fermentando açúcares e originando variedade de produtos finais. Dentre as bactérias entéricas, são encontradas várias linhagens patogênicas ao homem, a outros animais ou plantas, como também linhagens de importância industrial. Indubitavelmente, o conhecimento a respeito de *Escherichia coli* é superior ao de qualquer outra espécie de bactérias.

Uma das principais características taxonômicas que distingue os vários gêneros de bactérias entéricas corresponde ao tipo e proporção de produtos de fermentação originados a partir da glicose. Dois amplos padrões podem ser identificados: (**1**) **fermentação ácida mista e (2) fermentação de 2,3-butanodiol.** Na fermentação ácida mista, 3 ácidos são formados em quantidades significativas: acético, láctico e succínico, sendo também produzidos etanol, CO_2 e H_2, mas não butanodiol. Na fermentação de butanodiol, quantidades menores de ácidos são formadas, sendo butanodiol, etanol, CO_2 e H_2 os principais produtos.

Como resultados da fermentação ácida mista são produzidas quantidades iguais de CO_2 e H_2, enquanto na fermentação de butanodiol, a produção do CO_2 é consideravelmente maior que a de H_2. Isto porque os organismos que realizam fermentação ácida mista

produzem CO_2 somente a partir de ácido fórmico; o processo é mediado pelo sistema enzimático ***formiato hidrogênio liase***:

$$HCOOH\ (\textit{ácido fórmico}) \rightarrow H_2 + CO_2 \qquad (1)$$

Sendo que essa reação promove a formação de quantidades iguais de CO_2 e H_2. Os fermentadores de butanodiol também produzem CO_2 e H_2 a partir do ácido fórmico, gerando molécula adicional de CO_2 durante a formação de cada molécula de butanodiol.

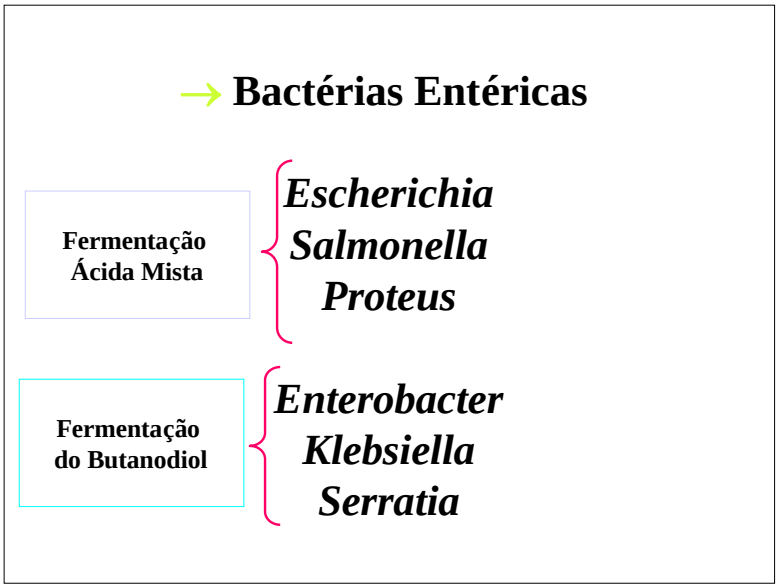


Figura 8.1. Bactérias entéricas que realizam Fermentação Ácida Mista e Fermentação do Butanodiol.

a. Fermentação ácida mista: *Escherichia*, *Salmonella* e *Shiguela*

Os membros do gênero *Escherichia* são considerados praticamente universais do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente. Devido à sua natureza aeróbia facultativa, esse microrganismo provavelmente também auxilia no consumo de oxigênio, tornando o intestino grosso sem oxigênio (anaeróbio). Linhagens selvagens de *Escherichia* raramente apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento, sendo capazes de crescer a partir de ampla variedade de fontes de carbono e energia, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros.

Algumas linhagens de *Escherichia* são patogênicas. Estas últimas estão envolvidas em diarreias de crianças; ocasionalmente, ocorrem em proporções epidêmicas em berçários

ou alas obstétricas, podendo também causar infecções do trato urinário de idosos ou em indivíduos que apresentem baixa resistência, em decorrência de tratamento cirúrgico ou exposição à radiação iônica. Linhagens enteropatogênicas de *E. coli* têm sido implicadas, com maior frequência, em infecções do tipo disentéricas e em febres generalizadas. Tais linhagens possuem antígeno K, que permite a adesão e colonização do intestino delgado, além de produzirem enterotoxina responsável pelos sintomas da diarreia.

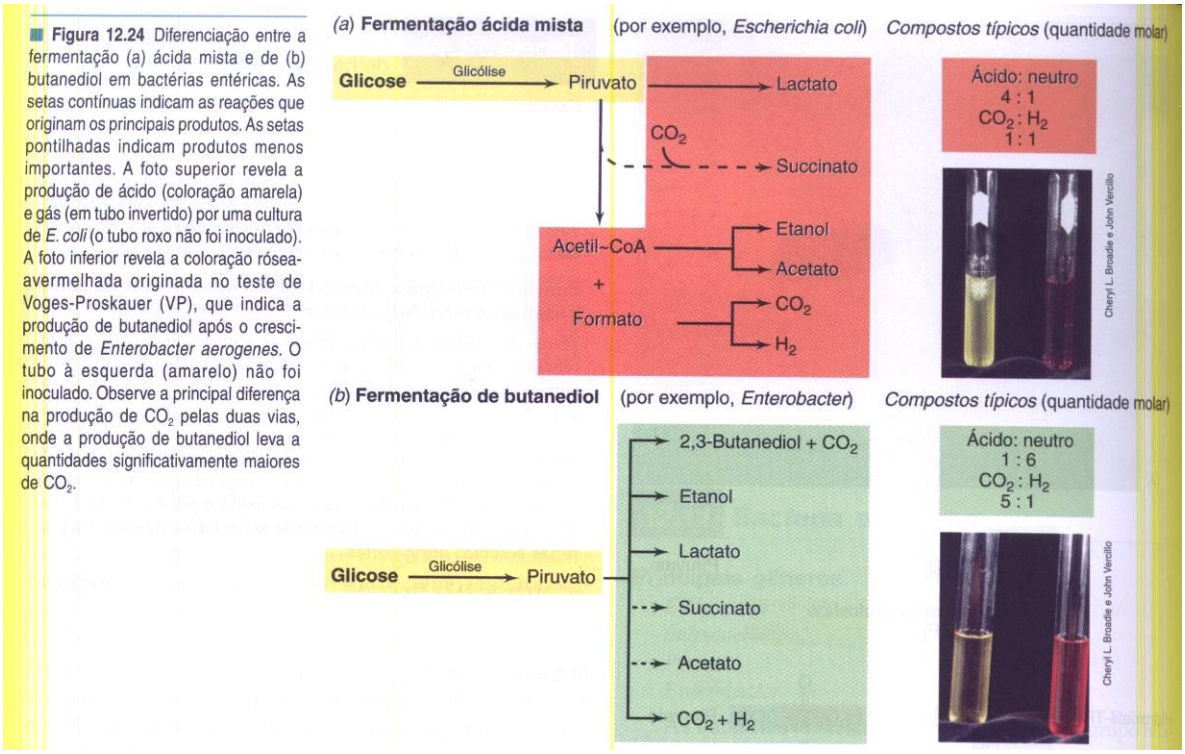


Figura 8.2. Diferenciação entre Fermentação Ácida Mista e Fermentação do Butanodiol.

Contrariamente à maioria das linhagens de *Escherichia*, os membros do gênero *Salmonella* são geralmente patogênicos tanto para humanos quanto para outros animais de sangue quente. Em humanos, as doenças mais comuns causadas por salmonelas são a febre tifoide e gastroenterites. As salmonelas se caracterizam imunologicamente com base em três antígenos de superfície celular: (**1**) antígeno O, ou de parede celular (somático) – são componentes lipopolissacarídicos presentes na membrana externa desses organismos; (**2**) antígeno H, ou flagelar; e (**3**) antígeno Vi (camada polissacarídica externa), encontrado principalmente em linhagens causadoras de febre tifoide.

As espécies de *Shigella* são geralmente patogênicas para o homem e provocam gastroenterite grave, usualmente denominada disenteria bacilar. *Shigella dysenteriae* é transmitida por alimentos e águas contaminadas, sendo capazes de invadir células epiteliais do intestino. Uma vez estabelecida, essa bactéria produz uma endotoxina e uma neurotoxina que exibe efeitos enterotóxicos.

O gênero *Proteus* caracteriza-se pela rápida motilidade e pela produção da enzima uréase. São causadoras de infecções do trato urinário em humanos, provavelmente, beneficiando-se de sua capacidade de degradar a ureia.

a. Fermentação de Butanodiol: *Enterobacter, Klebsiella* e *Serratia*

Enterobacter aerogenes é uma espécie comumente encontrada em águas e esgoto sanitário, bem como no trato intestinal de animais de sangue quente, sendo patógeno ocasional em infecções do trato urinário. *Klebsiella pneumoniae* provoca pneumonias em humanos, embora esse gênero seja mais comumente encontrado na água e solo. A maioria das linhagens de *Klebsiella* também é capaz de fixar N_2, uma propriedade não descrita para as outras enterobactérias. O gênero *Serratia* produz uma série de pigmentos vermelhos contendo pirrol, denominados **prodigiosinas**. Esse pigmento é produzido na fase estacionária de crescimento, como metabólito secundário (- produto de uma população de células, produzido após o microrganismo ter quase completado seu período de crescimento rápido e estar na fase estacionária do ciclo de crescimento). Esse pigmento contém o anel pirrólico também encontrado em pigmentos envolvidos em processos de transferência de energia: porfirinas, clorofilas e ficobilinas. No entanto, não há evidências sugerindo que a prodigiosina desempenhe qualquer papel na transferência de energia; sua real função é desconhecida. Espécies de *Serratia* podem ser isoladas da água e do solo, como também do intestino de vários insetos e vertebrados e, ocasionalmente, do intestino do homem.

PARTE PRÁTICA

As espécies microbianas podem diferir em sua capacidade de utilizar (fermentar) açúcares (glicose, lactose, maltose, sacarose, manose, xilose, etc.). A fermentação de determinados carboidratos, principalmente mono e dissacarídeos, é evidenciada pela produção de ácido e/ou gás no meio de cultura em pH neutro. Para detecção do ácido usa-se, em geral, meio básico contendo apenas uma fonte de carbono (açúcar que se deseja testar) e um indicador de pH. São as seguintes possibilidades de resultados:

1) Se o carboidrato não for fermentado (reação alcalina), a cor do meio permanece a mesma (teste negativo),

2) Se a bactéria fermentar o açúcar, o pH do meio diminui (reação ácida) e a cor do meio muda para vermelho (teste positivo),

3) A produção de gás pode ser avaliada pela presença de bolha no interior de pequeno tubo invertido (tubo de Durham) colocado no meio de cultura.

O teste do vermelho de metila visa identificar se a bactéria é capaz de produzir ácidos estáveis como produtos finais da fermentação mista da glicose. Certas bactérias fermentam a glicose com produção de ácidos (fórmico, acético, láctico e succínico) e gás, até que o pH do meio chegue a cerca de 5,0; o que pode inibir o crescimento da própria bactéria (por exemplo, *E. coli*). Outras como *Enterobacter*, apesar de também produzir ácidos são capazes de converter os ácidos em produtos neutros como 2,3 butanodiol, não provocando redução tão drástica de pH.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Numerar os tubos de ensaio de acordo com a numeração das culturas em suspensão. Inocular os tubos, contendo caldo Clark-Lubs, com duas alçadas e incubar por 48 horas à 30°C.

Composição do meio Clark e Lubs

Proteose peptona	5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	5g
Glicose	5g
Água destilada	1 L

Corrigir o pH para 7,0 – 7,2

Prova do Vermelho de Metila: o teste é realizado **após** crescimento, adicionando 5 gotas do indicador vermelho de metila. O teste é **positivo** quando há o aparecimento de cor **rosa avermelhado**, indicando **pH menor que 5**, e **negativo** quando a **cor é amarela**, indicando **pH maior que 5**.

Composição do reativo Vermelho de Metila

Vermelho de metila	0,1g
Álcool etílico 95%	300mL
Água destilada	500mL

pH de viragem 4,2 e 6,5

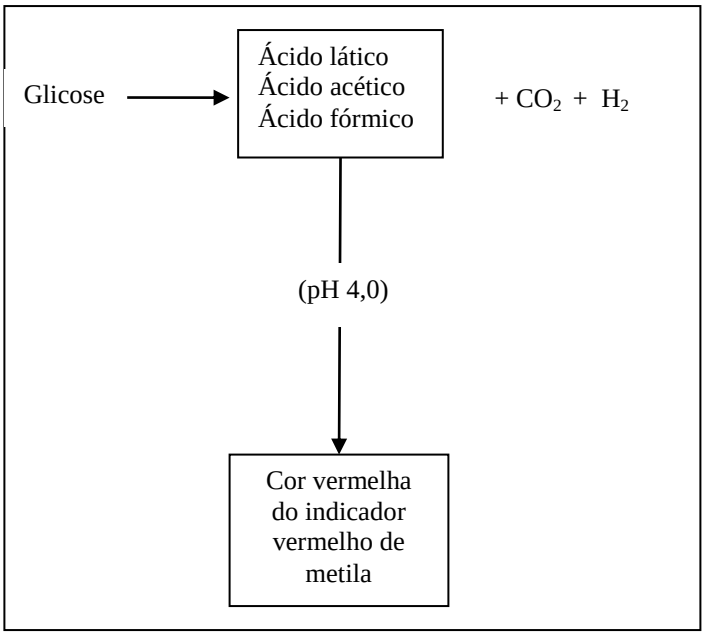


Figura 8.3. Resumo da reação de fermentação da glicose.

1. Produção de Indol

O teste do indol é utilizado para caracterizar e/ou identificar bactérias entéricas, que são capazes de **produzir indol** a partir do **aminoácido triptofano** através da ação da enzima triptofanase. O triptofano pode ser convertido, pela ação dessa enzima, a indol, amônia (por desaminação) e ácido pirúvico como produtos finais da reação.

O ácido pirúvico pode então gerar energia por meio do Ciclo de Krebs ou fermentação, e, portanto, ser usado para sintetizar outros componentes importantes e necessários para a célula. A amônia gerada pode ser utilizada na síntese de aminoácidos. O outro metabólito final gerado, indol, pode ser identificado por este teste. Desta forma, a triptofanase diferencia as bactérias entéricas que são **indol-positivas**, como *E. coli* e *Proteus vulgaris*, das bactérias entéricas **indol-negativas**, como *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes*.

O meio para verificação de sua produção deve incluir algum tipo de proteína contendo o aminoácido, por exemplo, peptona (triptona). A prova é realizada inoculando-se o meio contendo excesso de triptofano.

PARTE PRÁTICA

O reativo de Kovac contendo HCl e dimetil-amino-benzaldeído dissolvido em álcool etílico reagem com indol produzido pelos microrganismos **indol-positivos**, produzindo **coloração róseo-avermelhada**. Caso não ocorra mudança de cor e seja verificada **cor amarelada**, o teste é considerado **negativo**.

Composição do Reativo de Kovac

ρ-dimetil-amino-benzaldeído	2 g
Álcool etílico absoluto	190 g
HCl concentrado	40 ml

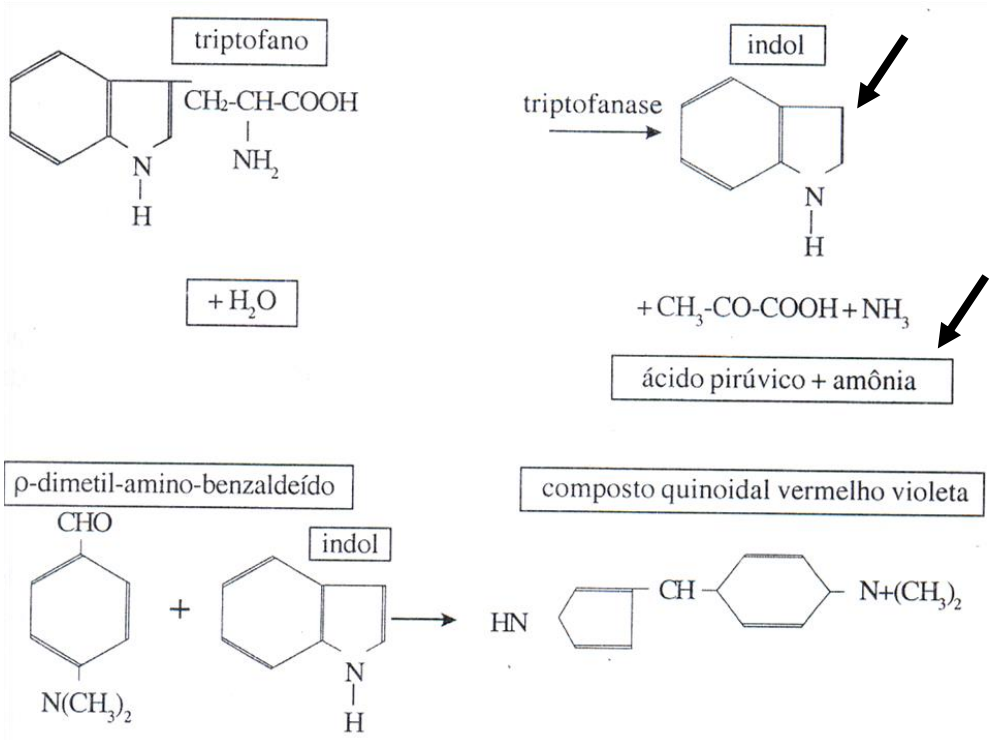


Figura 8.4. Degradação enzimática do triptofano e reação de indol (adaptado de Cappucino; Sherman, 1998).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Numerar os tubos de ensaio de acordo com a numeração das culturas em suspensão. Inocular os tubos, contendo caldo indol, com duas alçadas e incubar por 48 horas à 30°C.

Após a incubação colocar 0,5 ml do reativo de Kovac, através da parede interna do tubo de cultura e deixar repousar. A camada alcoólica irá se separar da camada aquosa e, após alguns minutos, surgirá um anel. A prova é **positiva** quando na porção superior

(camada alcoólica), i.e., na interface da cultura e reativo, **desenvolver um anel de cor róseo-avermelhada dentro de no máximo 5 minutos. Este resultado é devido à complexação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido**. Caso não ocorra mudança de cor (cor original) ou verificada cor amarelada, o teste é considerado negativo.

Composição do Caldo Indol

Triptona	5 g
NaCl	2,5 g
Água destilada	1 L

3. Hidrólise do Amido

O teste é utilizado para diferenciar bactérias capazes de hidrolisar o amido por meio da ação da enzima amilase. O teste ajuda na diferenciação de espécies de *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Streptococcus*. O amido é um homopolissacarídeo, composto de repetidas subunidades de α-D-glicose. Como o polímero é muito grande, sua utilização pelos microrganismos deve ser precedida da degradação, com formação de substâncias mais simples e facilmente assimiláveis. Ele se apresenta como uma mistura, onde temos a presença de duas formas principais: (1) uma linear, conhecida como **amilose** e (2) uma ramificada, denominada **amilopectina**. Tanto na amilose, quanto na amilopectina, as moléculas de glicose são unidas por ligações 1,4-α-glicosídica.

O amido possui estrutura muito grande para atravessar a membrana celular bacteriana, e, por isso, para se tornar fonte de energia valiosa para a bactéria, precisa ser reduzido a pequenos fragmentos ou mesmo, em moléculas individuais de glicose para que possam funcionar como substratos energéticos. Muitas espécies bacterianas produzem e secretam as enzimas **α-amilase** e **oligo-1,6-glicosidase**, as quais catalisam a hidrolise do amido por meio da lise das ligações glicosídicas entre as subunidades de açúcar. Embora este seja o passo inicial do processo, várias outras enzimas, por exemplo, enzimas da via glicolítica são necessárias para que todo o processo metabólico aconteça até a geração de ATP.

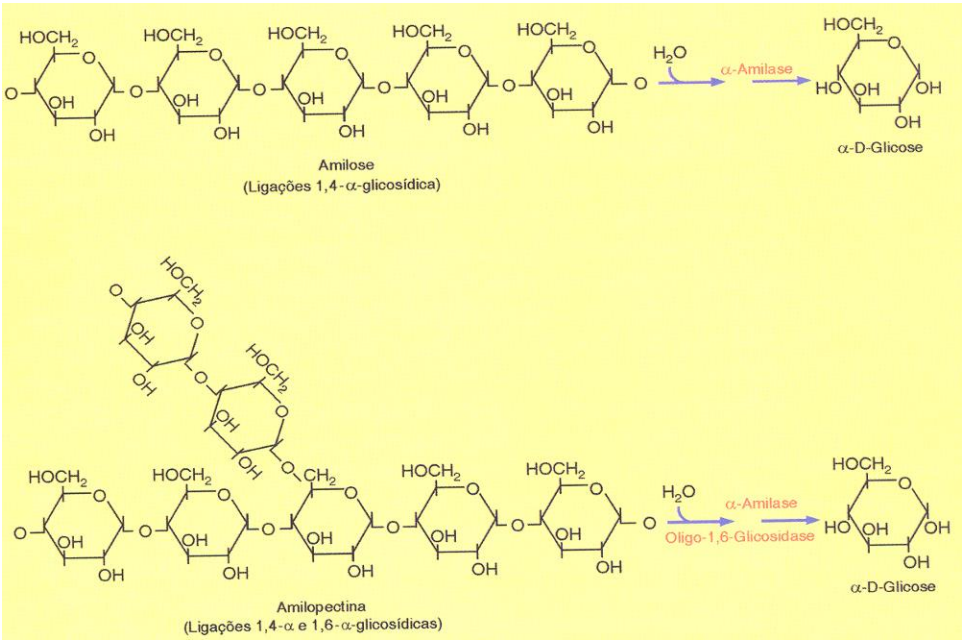


Figura 8.5. Hidrólise do amido pela α-amilase e oligo-1,6-glicosilase.

Muitas espécies bacterianas são capazes de produzir **amilases** que catalisam a hidrólise do amido com formação de **maltose**. A maltose pode, então, entrar na célula onde é hidrolisada à glicose. Em alguns casos a hidrólise do amido é incompleta, resultando no acúmulo de dextrinas no meio.

O meio utilizado para este teste é um meio ágar simples que contém extrato de carne para promover o crescimento, e amido solúvel, que deve ser disposto em placas de Petri, as quais, após a solidificação do meio, são utilizadas para a prova.

PARTE PRÁTICA

Quando organismos que produzem α-amilase e oligo-1,6-glicosidase crescem no meio rico em amido, eles hidrolisam o amido, aumentando assim o crescimento no meio devido ao alto teor energético fornecido através da liberação de grandes quantidades de glicose, que, juntamente com o extrato de carne, favorecem substancialmente o desenvolvimento do microrganismo. Como tanto o amido quanto as subunidades de açúcares são solúveis no meio, o **iodo** presente na solução é usado para detectar a **presença ou ausência de amido** na periferia ao redor do crescimento bacteriano, na superfície do meio de cultura. Como o iodo reage com o amido e produz uma **coloração azul-violácea intensa,** qualquer traço de hidrólise do amido promovido pela bactéria será revelado como uma **zona clara** ao redor do crescimento, representando resultado positivo para o teste.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Cada grupo deverá pegar a placa contendo ágar amido e abri-la próximo ao gramado atrás e a frente do prédio da Engenharia Ambiental. Deixar que ocorra a inoculação por 10 minutos, depois tampá-la e incubá-la à 30°C por 48 horas.

Após a incubação, cobre-se a superfície do meio com solução de iodo (5 a 10ml) e observa-se a coloração. Pode ser usada a mesma solução de Lugol utilizada para a coloração de Gram, para a revelação da prova. O amido se cora de azul com iodo, mas seus produtos (**dextrinas maltoses e glicose**) não produzem essa reação.

Composição do Meio Ágar Amido

Amido	2g
Na_2HPO_4	1g
Extrato de carne	10g
NaCl	5g
Agar	15g
Água destilada	1 L

Composição do Reativo Lugol

Iodo	1 g
Iodeto de Potássio (KI)	2 g
Água destilada	100 ml

Azul: amido presente – não houve hidrolise,

Incolor: hidrolise completa pela ação de β- amilases,

Vermelho: hidrólise parcial pela ação de α- amilases.

4. Teste de Oxidação/Fermentação (O/F)

A conversão de carboidratos em produtos ácidos pode ocorrer tanto aerobiamente, pela oxidação, como anaerobiamente, pela fermentação. Desta forma, os microrganismos que oxidam os carboidratos são denominados **aeróbios**, enquanto outros crescem, realizam seu metabolismo e se reproduzem em condições aeróbias ou anaeróbias, e por isso, chamados de **anaeróbios facultativos**. De forma geral, a maior parte das bactérias de interesse médico e biotecnológico são anaeróbias facultativas.

O teste de oxidação/fermentação é utilizado para diferenciar microrganismos de acordo com a sua habilidade em oxidar ou fermentar açúcares específicos e, portanto, determinar se uma bactéria é aeróbia ou anaeróbia facultativa. Este teste é capaz de distinguir bacilos Gram-negativos que são aeróbios, como *Pseudomonas aeruginosa*, daqueles que são anaeróbios facultativos, como *E. coli*. O teste também distingue cocos Gram-positivos que são aeróbios, como as espécies de *Micrococcus*, dos que são anaeróbios facultativos, com as espécies de *Staphylococcus*.

O meio usado para este teste é um meio semi-sólido (em virtude da baixa concentração de ágar) denominado de meio de oxidação/fermentação, o qual contém baixa concentração de peptona, suficiente para permitir o crescimento. Esta baixa concentração de peptona é essencial para limitar a formação de produtos alcalinos que poderiam neutralizar o efeito da produção de ácidos. Um carboidrato, como a glicose, lactose, maltose, sacarose, manitol ou xilose é adicionado em altas concentrações, o que promove a utilização do carboidrato resultando na formação de produtos ácidos. Neste meio, utiliza-se o indicador de **pH azul de bromotimol**, que possui coloração **inicial verde a pH 7,1 e se torna amarelo em pH 6,0 e azul em pH 7,6.**

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do teste, dois tubos contendo o meio com o açúcar específico são inoculados com o microrganismo a ser testado, com auxílio de alça de platina estéril. Após a inoculação, um dos tubos é então selado com 2,0 a 3,0 ml de óleo mineral (por exemplo, vaselina líquida), criando assim ambiente anaeróbio, visto que o óleo mineral retarda a difusão do oxigênio dentro do meio. O outro tubo é deixado aberto em contato com o ar, permitindo assim crescimento aeróbio. Os dois tubos são então incubados a 30^{o}C por 48 horas, para posterior análise da mudança de cor.

Interpretação dos Resultados

- **Coloração azulada ou não alteração da cor inicial verde**, em ambos os tubos (aeróbio e anaeróbio) = indica que os microrganismos não são capazes de utilizar o carboidrato testado.
- **Mudança de cor do indicador para amarelo**, tanto no tubo selado com o óleo como no tubo não-selado com o óleo = indica que os microrganismos são capazes de fermentar e oxidar o açúcar, respectivamente.

Microrganismos capazes de metabolizar somente pelo **processo de oxidação** promoverão mudança de **cor para amarelo somente no tubo não-selado**, deixando o tubo selado com coloração verde ou azul.

Inóculos

1. Suspensão microbiana (Amostra A) - Inocular dois tubos: (1) sob condições aeróbias com rodilhão de algodão e (2) sob condições anaeróbias com 2 ml de óleo mineral.

2. Suspensão microbiana (Amostra B) - Inocular dois tubos: (1) sob condições aeróbias com rodilhão de algodão e (2) sob condições anaeróbias com 2 ml de óleo mineral.

Incubar todos os tubos a 30^{o}C por 48 horas. Anotar os resultados.

Meio de cultura com ágar e solução de azul de bromotimol

Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0g
Peptona	2,5g
Glicose	10g
Ágar	5g
Azul de Bromotimol	40 ml (solução 1:500)
Água destilada	1000 ml

Antes de adicionar o ágar, corrigir o pH para 7,1. Adicionar o ágar, transferir para micro-ondas para solubilizar o ágar, distribuir nos tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121^{o}C, 1 atm durante 20 minutos.

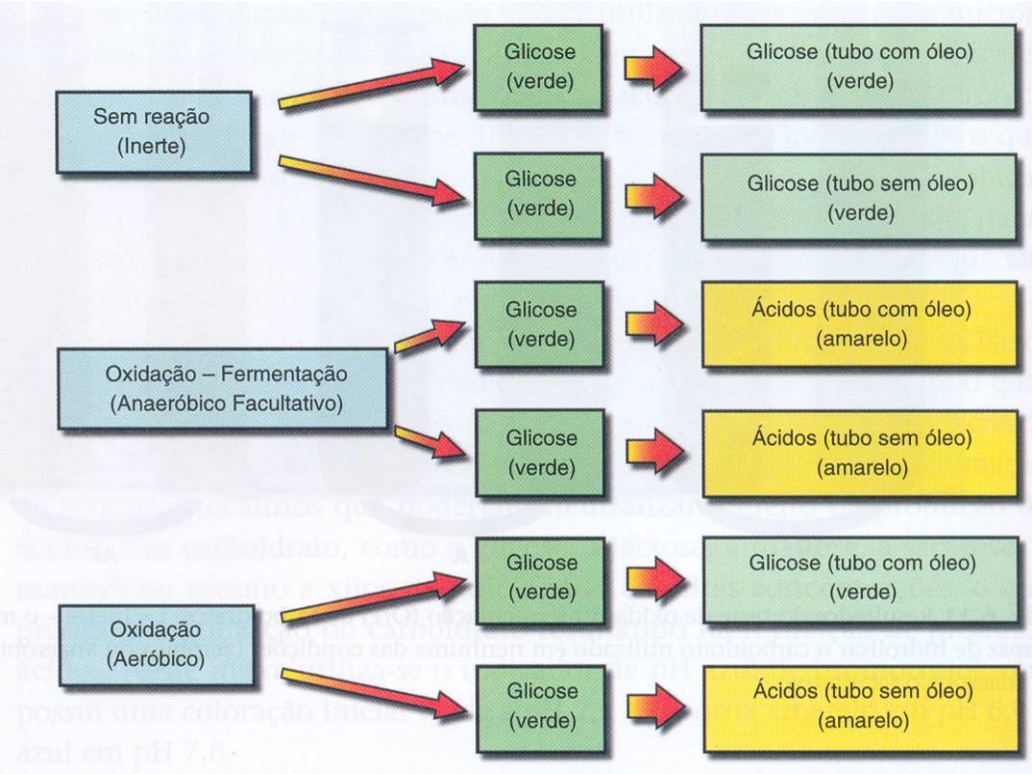


Figura 8.6. Sumário de possíveis resultados do teste de O/F. O açúcar utilizado foi a glicose, mas o teste poderá ser feito utilizando-se outro carboidrato como única fonte de açúcar.

5.Teste da Catalase

Este teste é utilizado para identificar organismos que produzem a enzima catalase, visto que algumas bactérias produzem peróxido de hidrogênio durante a respiração aeróbia.

Os microrganismos anaeróbios podem ser mortos pelo oxigênio, não podem crescer na presença do ar e não utilizam oxigênio para as reações de produção de energia. Alguns anaeróbios podem tolerar baixas concentrações de oxigênio, mas os anaeróbios estritos são mortos por breve exposição ao gás.

A toxicidade do oxigênio para os anaeróbios estritos deve-se a certas moléculas produzidas durante as reações envolvendo oxigênio. Algumas destas reações resultam na adição de um único elétron a molécula de oxigênio, formando um ***radical superóxido***.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \ (radical\ superóxido) \qquad (2)$$

Os radicais superóxidos podem causar danos às células, mas também dão origem ao **peróxido de hidrogênio** (H_2O_2) e ***radicais hidroxila*** (OH), que podem destruir os componentes vitais da célula. Os radicais hidroxila são produzidos a partir dos radicais

superóxido por meio de duas reações. Na primeira etapa, dois radicais superóxido reagem um com o outro para produzir peróxido de hidrogênio, H_2O_2:

$$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \quad (3)$$

No segundo passo, os radicais superóxido reagem com o peróxido de hidrogênio na presença de complexos de ferro para formar radicais hidroxila:

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH + OH \quad (4)$$

Os radicais hidroxila têm vida muito curta, durando menos de 1/10.000 segundos, porque estão entre as substâncias químicas mais reativas conhecidas. Eles podem danificar quase todo tipo de molécula encontrada na célula viva, incluindo o material genético DNA.

Os microrganismos aeróbios, microrganismos facultativos que crescem em aerobiose e alguns microrganismos anaeróbios têm desenvolvido vários mecanismos protetores contra estas formas tóxicas de oxigênio. Um dos mecanismos é a produção da enzima ***superóxido dismutase***, que elimina os radicais superóxido convertendo-os rapidamente em peróxido de hidrogênio, como mostrado na Equação (2). O peróxido de hidrogênio produzido por esta reação pode ser metabolizado por duas outras enzimas: ***catalase***, que converte peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água; e ***peroxidase***, que converte peróxido de hidrogênio em água. A eliminação do radical superóxido e peróxido de hidrogênio significa que a reação na Equação (3) não ocorre mais e que os radicais hidroxila não serão formados.

A reação da catalase é utilizada para identificar algumas espécies bacterianas. Quando uma gota de peróxido de hidrogênio é adicionada a uma colônia de células bacterianas contendo catalase, bolhas de oxigênio são imediatamente liberadas. Tais bactérias são denominadas *catalase-positiva*.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Com auxílio da alça de platina transferir uma colônia da placa de petri (crescida em Agar Nutriente) para uma lâmina de vidro. Adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio e observar a reação. O teste da catalase pode ser feito tanto em lâmina de vidro comum (utilizada em microscopia) contendo porção do material fresco a ser analisado como diretamente em ágar inclinado contendo colônias viáveis do espécime em análise. Devem ser adicionadas algumas gotas de uma solução de peróxido de hidrogênio (água oxigenada, 3%) no material após 18-24 horas de crescimento.

O peróxido de hidrogênio é extremamente instável e, portanto, deve ser utilizada uma solução de preparo recente. O oxigênio liberado leva à formação de bolhas, como uma efervescência, em apenas alguns segundos, o que indica positividade para o teste. A ausência de bolhas é considerada como teste negativo.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 9: QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES FECAIS E TOTAIS – MÉTODO COLILERT

INTRODUÇÃO

A maior parte dos microrganismos presentes em águas naturais são inofensivos à saúde humana, entretanto, a contaminação das águas de abastecimento pelo despejo de esgoto sanitário pode causar a sua contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos. Desta forma, um dos objetivos das análises microbiológicas qualitativas e quantitativas de diferentes amostras, como as amostras de água, é o de inferir a sua potabilidade por meio da detecção de microrganismos possivelmente causadores de doenças, como aqueles presentes nas fezes de animais, entre eles os seres humanos.

As bactérias do grupo dos coliformes são usadas como indicadores da qualidade da água, sendo a *Escherichia coli* seu principal representante. Entre suas principais características, os coliformes totais podem ser descritos como bacilos *gram* negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35±0,5°CC em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima ß-galactosidase. Entre os principais gêneros, destacam-se *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Os coliformes termotolerantes são um subgrupo de origem exclusivamente fecal dos coliformes, sendo a espécie *Escherichia coli* a principal representante e sendo caracterizados por fermentar lactose e manitol a 44,5±2°C em 24 horas, com produção de ácido e gás.

Este grupo de bactérias são comumente encontrados nas fezes de animais de sangue quente. São facilmente detectáveis e quantificáveis por técnicas relativamente simples e sua concentração é proporcional ao nível de contaminação fecal da amostra. O tempo de sobrevivência dos coliformes termotolerantes na água é maior do que das bactérias patogênicas intestinais, pois são menos exigentes em termos nutricionais e são incapazes de se multiplicar no ambiente aquático ou se multiplicarem menos que as bactérias entéricas. Além disso, são mais resistentes aos agentes tensoativos e agentes desinfetantes do que bactérias patogênicas. A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade) estabelece que seja verificada, na água para consumo humano para garantir sua potabilidade.

Tabela 9.1. Valores máximos permitidos de coliformes totais e termotolerantes segundo a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde.

Tipo de água		**Parâmetro**		**Valor Máximo Permitido (VMP)**
Água para consumo humano		*Escherichia coli*		Ausência em 100 ml
Água Tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais		Ausência em 100 ml
	No sistema de distribuição (reservatório e rede)	*Escherichia coli*		Ausência em 100 ml
		Coliformes totais	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
			Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100 ml em 95% das amostras examinadas no mês

Método de Colilert

O método de Colilert é um dos métodos quantitativos indicados para análise e quantificação de bactérias do grupo dos coliformes totais e/ou termotolerantes presentes em variados tipos de amostras, entre elas as amostras ambientais, especialmente de águas potáveis. Este método consiste na mistura entre a amostra e o reagente de Colilert, sendo que 100 ml desta mistura deve ser posteriormente transferida para uma cartela de Colilert estéril, selada e incubada a 35°C durante 24h (1° leitura) e 48h (2° leitura/leitura de confirmação). Os resultados são obtidos pela relação de valores positivos entre os quadrados maiores e menores da cartela, com aqueles verificados na tabela padrão para o teste Colilert.

A base do ensaio é a Tecnologia de Substrato Definido (DST, do inglês *Defined Substrate Technology*). O método consiste em um ensaio tipo presença/ausência (PA) ou

tipo número mais provável (NMP), onde a amostra adquire cor amarela quando as bactérias coliformes metabolizam o ONPG, que serve como nutriente e indicador, e fluoresce sob luz UV quando a *E. coli* metaboliza o MUG, um outro nutriente e indicador.

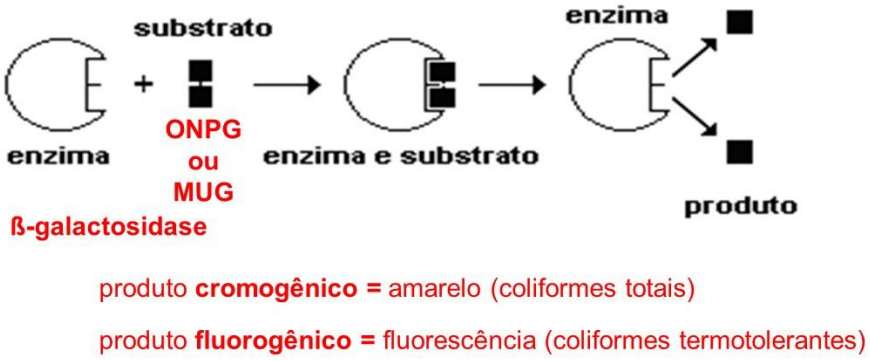


Figura 9.1. Tecnologia do Substrato Definido, base do método de Colilert.

OBJETIVO

Demonstrar o funcionamento e aplicação do método colorimétrico de quantificação de bactérias do grupo dos coliformes totais e termotolerantes via método de Colilert.

MATERIAIS

VIDRARIAS E DEMAIS MATERIAIS

- Becker;
- Proveta;
- Pipetas de vidro;
- Peras plásticas;
- Pipeta automática com ponteira para 5 ml e 10 ml;
- Pisseta com água destilada;
- Pérolas de vidro.

REAGENTES

- Água de diluição (ver Aula III);
- Reagente de Colilert;

EQUIPAMENTOS

- Bico de Bunsen;
- Seladora para cartelas Colilert;
- Câmara escura equipada de radiação UV;
- Estufa com temperatura controlada (35°C);
- Autoclave;
- Balança analítica;
- Micro-ondas.

PROCEDIMENTOS

Parte I- Preparação da amostra (diluição)

1. Agitar a amostra manualmente e coletar 10 ml utilizando uma micropipeta ajustada para o volume adequado;
2. Transferir a amostra para o frasco de diluição (1), contendo 90 ml de água deionizada;
3. Agitar o conteúdo do frasco de diluição (1) manualmente e transferir 10 ml da amostra para um novo frasco de diluição (2).
4. Repetir o procedimento conforme a abaixo.

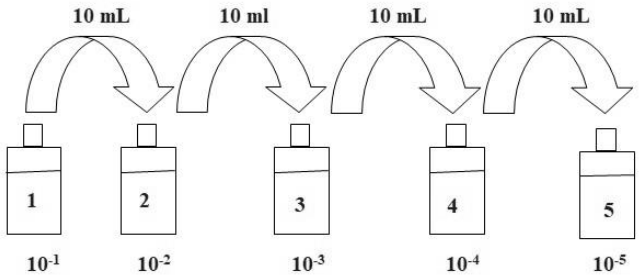


Figura 9.2. Sequência de diluição de amostra.

Parte II- Incubação

1. Em cada amostra, adicionar uma cartela do reagente de Colilert e agitar até completa dissolução;

2. Transferir o conteúdo de cada frasco de diluição (100 ml) para uma cartela de Colilert estéril e selar a cartela, que deve ser mantida em incubadora termo regulável a 35±2ºC por um período de 24 horas;

3. Verificar os resultados positivos (mudança de coloração para amarelo forte) e negativos (sem mudança de coloração) e anotar os resultados positivos nos quadrados grandes (49 espaços) e pequenos (48 espaços). Estes resultados são relativos à presença de coliformes totais.

4. Verificar novamente os resultados e obtidos em câmara escura equipada de luz UV, onde os resultados positivos apresentarão luminescência azul. Estes resultados são relativos à presença de coliformes termotolerantes.

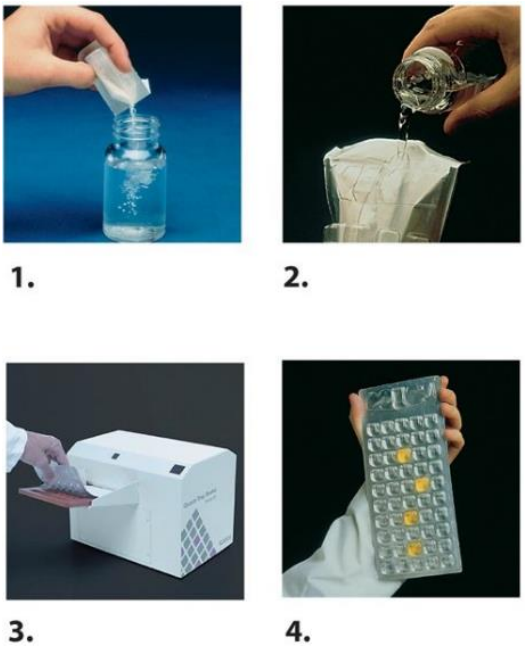


Figura 9.3. Procedimentos para determinação de coliformes totais e termotolerantes via método de Colilert. (1) adição do reagente, (2) transferência da amostra para a cartela de Colilert, (3) Incubação e (4) análise dos resultados.

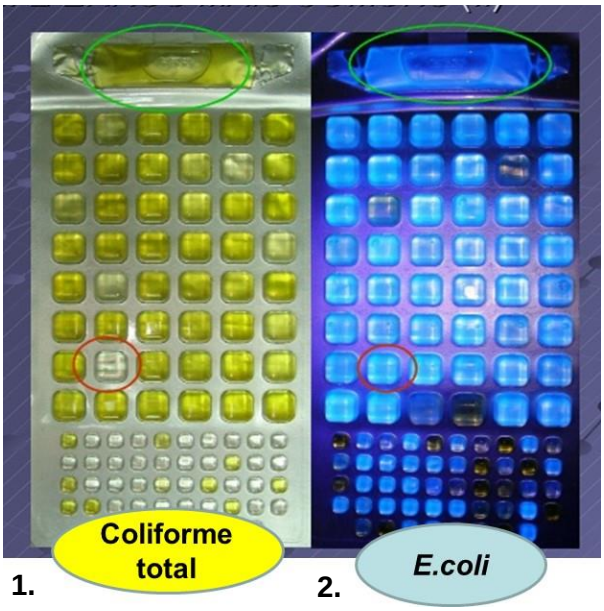


Figura 9.4. Cartela de Colilert após o período de incubação e resultados observados a olho nu para verificação de coliformes totais (1) e em luz UV para observação de coliformes termotolerantes (2).

Parte III- Cálculo do Número Mais Provável (NMP/100 ml)

Após a obtenção dos resultados como descrito na Parte II, deve se realizar a correlação entre os valores observados nos quadrados grandes com aqueles observados nos quadrados pequenos. Exemplo: Se para 100 ml de amostra, observou-se 10 quadrados positivos grandes e 15 quadrados positivos pequenos para coliformes totais e 5 quadrados positivos grandes e 3 quadrados positivos pequenos para coliformes fecais, os valores observados seriam 28 NMP/100 ml e 8,2 NMP/100 ml, respectivamente. Os valores observados devem ser multiplicados pelo fator de diluição, se houver.

Tabela 9.2. Índices do NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos via método de Colilert.

IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	435.2

cont. Índices do NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos via método de Colilert.

IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table *(per 100ml)*

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																						
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.8	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.2	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.3	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.8	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.1	452.0	467.4	483.3	499.6	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.3	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.6	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.2
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1986.3	2419.6	>2419.6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME 04092. Instruction manuals for use of: Colilert®, Quanti-Tray®/2000, and Quanti-Tray Sealer®.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Method 9223 B., APHA, 21st Edition, 2005.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde – 4. ed. – Brasília: Funasa, 2013. 150 p.

ANOTAÇÕES

AULA PRÁTICA 10: BACTERIOCLOROFILA E CAROTENÓIDES DE BACTÉRIAS FOTOTRÓFICAS ANOXIGÊNICAS

As bactérias fototróficas anoxigênicas são divididas em seis famílias incluídas na ordem Rhodospirillales e Chlorobiales. As púrpuras, são representadas pelas Famílias Chromatiaceae, Rhodospirillaceae e Ectothiorhodospiraceae; enquanto as verdes incluem as Famílias Chloroflexaceae, Chlorobiaceae e Heliobacteriaceae. A maioria desses microrganismos tem características morfológicas encontradas nos organismos procariotos de modo geral. Entretanto, os aspectos fisiológicos e ecológicos peculiares para determinada família taxonômica são propriedades inerentes de cada espécie dentro do grupo.

As bactérias **não sulfurosas**, incluídas nas Famílias Rhodospirillaceae e Chloroflexaceae, são metabolicamente mais versáteis que as **sulfubactérias verdes** (Chlorobiaceae) e **púrpuras** (Chromatiaceae e Ectothiorhodospiraceae). Esse aspecto está relacionado, principalmente, ao metabolismo fotossintético das sulfubactérias pigmentadas, que é restrito ao uso dos componentes reduzidos de enxofre.

Dependendo de alguns fatores, incluindo a concentração de sulfeto, pH e intensidade luminosa; as sulfubactérias oxidam anaerobiamente o sulfeto em enxofre elementar ou sulfato. Em baixas concentrações, o enxofre elementar não será acumulado, e deste modo ocorrerá a oxidação direta à sulfato, durante a redução do dióxido de carbono.

As **sulfubactérias púrpuras e verdes** são fototróficas utilizadoras de **sulfeto**. Assim, o desenvolvimento desses microrganismos é observado em ambientes aquáticos, principalmente nas zonas anaeróbias onde o sulfeto biogênico e abiogênico acumulam-se em quantidades significativas, assumindo-se, portanto, que o crescimento na natureza é principalmente fototrófico.

No crescimento fototrófico, a luz é usada principalmente na geração de ATP. A presença da potência redutora, em relação às anoxigênicas, dependerá da fonte de carbono presente. Quando o dióxido de carbono é a única fonte disponível, então a potência redutora será necessária e poderá vir de um composto reduzido de enxofre, do hidrogênio ou de um substrato orgânico. Compostos de enxofre, com nível de oxidação abaixo do sulfato, são comumente usados pelas bactérias fototróficas como doadores de elétrons. Por outro lado,

semelhantemente aos demais microrganismos, fungos e plantas, essas bactérias necessitam de enxofre para a síntese dos constituintes celulares.

As sulfubactérias púrpuras são também capazes de usar o tiossulfato ou hidrogênio, e com o mesmo comportamento quando crescem na presença de sulfeto, ou seja, o dióxido de carbono é assimilado autotroficamente por reações do Ciclo de Calvin.

O principal papel metabólico e necessidade de realizar fotossíntese são para a produção rápida de metabólitos necessários para a síntese de novas proteínas, lipídeos e outras substâncias relacionadas diretamente com o desenvolvimento celular e reprodução. Durante a reação fotossintética, ocorre a produção de ATP e NADH, juntamente com a formação de moléculas ricas em energia, como o glicogênio e o poli-β-hidroxibutirato.

Esquema geral e simplificado das reações que ocorrem no crescimento fotoautotrófico de *Chromatium vinosum* (sulfubactéria púrpura), está apresentado na Figura 10.1. A liberação dos elétrons durante a oxidação do sulfeto a enxofre (reação 1) e deste a sulfato (reação 2) é acompanhada pela redução dos transportadores de elétrons; representado pelo NAD.

A geração de ATP pela fotofosforilação (reação 5), juntamente com o NADH produzido, permite que o dióxido de carbono seja fixado (reação 4) através do Ciclo de Calvin, resultando na formação de produtos metabólicos intermediários que serão utilizados no crescimento celular (reação 8), ou na síntese de carboidratos de reserva, como o glicogênio (reação 6) e poli-β-hidroxibutirato (PHB, reação 9). Esses compostos podem ser degradados durante a síntese do material celular estrutural, na última fase do crescimento (reações 7 e 10). Ainda nesta fase, substâncias orgânicas poderão ser excretadas (reação 11) e reassimiladas (reação 12).

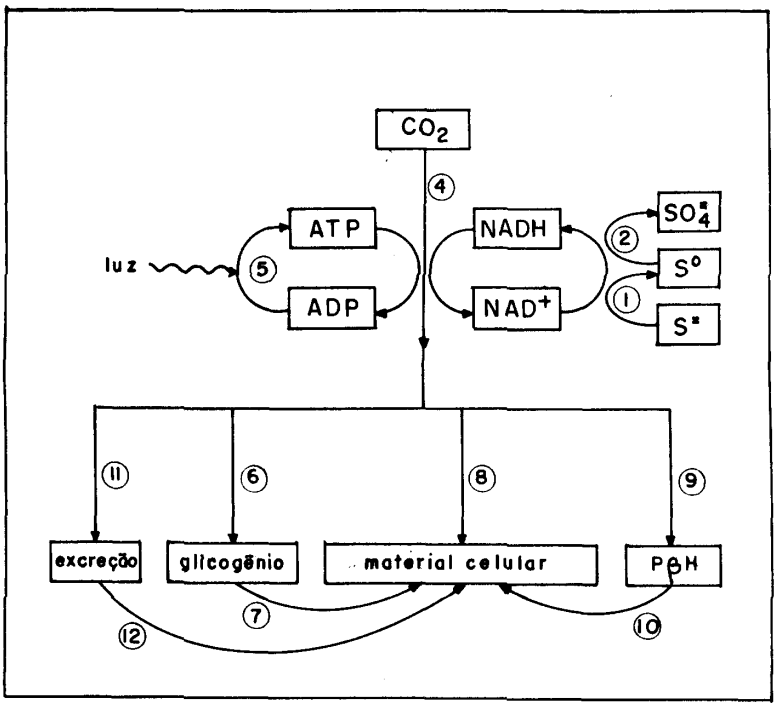


Figura 10.1. Esquema simplificado do metabolismo de *Chromatium* em condições fotoautotróficas

As principais propriedades das bactérias púrpuras e verdes, estão relacionadas às bacterioclorofilas (Bcl) e os sistemas de membranas fotossintéticas. Existem vários tipos de bacterioclorofilas (Bcl), diferindo nos substituintes de várias partes do anel porfirino. Essas modificações conduzem a variações no espectro de absorção e permitem a utilização de comprimentos de onda particulares. Na Figura 10.2 tem-se a estrutura química da bacterioclorofila e na Tabela 10.1 os diferentes arranjos de todas as bacterioclorofilas conhecidas.

Tradicionalmente, a taxonomia das bactérias fototróficas anoxigênicas foi baseada na presença de um tipo particular de bacterioclorofila. A maioria das espécies púrpuras (Famílias Chromatiaceae e Rhodospirillaceae) possuem **Bcl "a"**, com absorção próxima ao infravermelho, entre **800 e 860 nm**. Outras púrpuras, como por exemplo, *Rhodopseudomonas viridis*, tem **Bcl "b"**, com absorção no infravermelho ligeiramente acima de **1.000 nm** (MADIGAN, 1988; AMESZ & KNAFF, 1988). Esses pigmentos tem estrutura tetrapirrólica e são similares a **clorofila "a"** das plantas superiores, sendo que a diferença principal em relação a esta última, está no anel II, em que nas **Bcl "a"** e **"b"**, este anel não faz parte da estrutura ressonante.

O espectro de absorção das **bactérias verdes** encontra-se na faixa de **460 a 750 nm**, e está relacionado com os clorossomos que contêm as **Bcl "c"**, **"d", "e"**; ou, **"c_s"** em *Chloroflexus*. Todas essas bactérias possuem pequenas quantidades de **Bcl "a"** localizada na membrana citoplasmática.

Além desses pigmentos, foi descrita também uma Bcl estruturalmente única, denominada **Bcl "g"**, presente na família Heliobacteriaceae (*Heliobacterium chlorum*, *Heliospirillum* sp e *Heliobacillus* sp); e de interesse renovado no estudo da evolução da fotossíntese. Contrariamente a todas as outras Bcls, mas semelhante a **clorofila "a"**, Bcl "g" contém o grupo vinil ($H_2C=CH_2$) no anel I da molécula de tetrapirrol, enquanto as demais possuem um grupo álcool ou acetila. A única diferença estrutural com a clorofila "a" está no anel II da molécula, como pode ser observado na Tabela 10.1 e Figura 10.3.

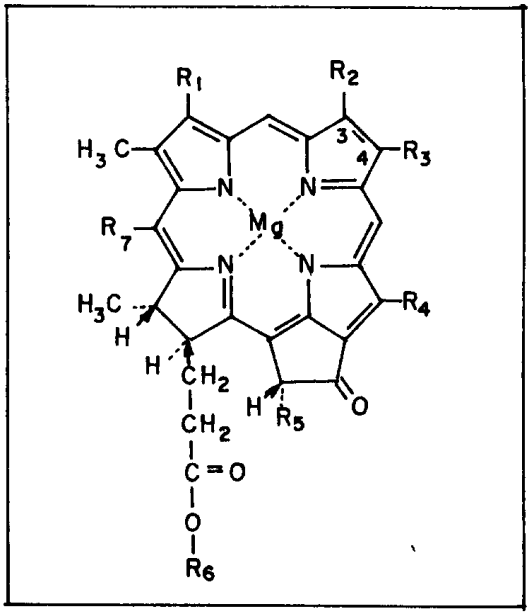


Figura 10.2. Estrutura química da bacterioclorofila. R_1 - R_7 representam os substituintes característicos dos diferentes tipos de bacterioclorofilas.

Tabela 10.1. Estruturas químicas das bacterioclorofilas com os respectivos comprimentos de onda em extração em metanol e "in vivo".

BACTERIO CLOROFILA	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6 ++	R_7	ABSORÇÃO MÁXIMA (nm) in vivo	ABSORÇÃO MÁXIMA (nm) EXTRAÇÃO METANOL	DISTRIBUIÇÃO
a	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	$-CH_3$	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-CH_3$	P/Gg	$-H$	805 830 – 890	771	Púrpuras (pequena quantidade nas verdes)
b	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_3$	$-CH_3$	$=C(H)-CH_3$	$-CH_3$	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-CH_3$	P	$-H$	835 – 850 1020 – 1040	794	Púrpuras (poucas espécies)
c	$-\overset{H}{\underset{OH}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$(?)	$-H$	F	$-CH_3$	745 – 755	660 – 669	Verdes (certas espécies)
c_S	$-\overset{H}{\underset{OH}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-H$	S	$-CH_3$	740	667	Chloroflexus aurantiacus
d	$-\overset{H}{\underset{OH}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$ (?)	$-H$	F	$-H$	705 – 740	654	Verdes (certas espécies)
e	$-\overset{H}{\underset{OH}{C}}-CH_3$	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-H$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$	$-H$	F	$-CH_3$	719 – 726	646	Verdes (espécies de coloração marrom)
g	$-\overset{H}{C}=CH_2$	$-CH_3$	$-C_2H_4$	$-CH_3$	$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-CH_3$	F	$-H$	788, 670	765	Heliobacterium chlorum Heliospirillum sp Heliobacillus sp

++ P = éter fitil ($C_{20}H_{39}O-$); F = éster farnesil ($C_{15}H_{25}O-$); G = éster geranilgeraniol ($C_{10}H_{17}O-$); S = álcool estearil ($C_{18}H_{37}O-$).

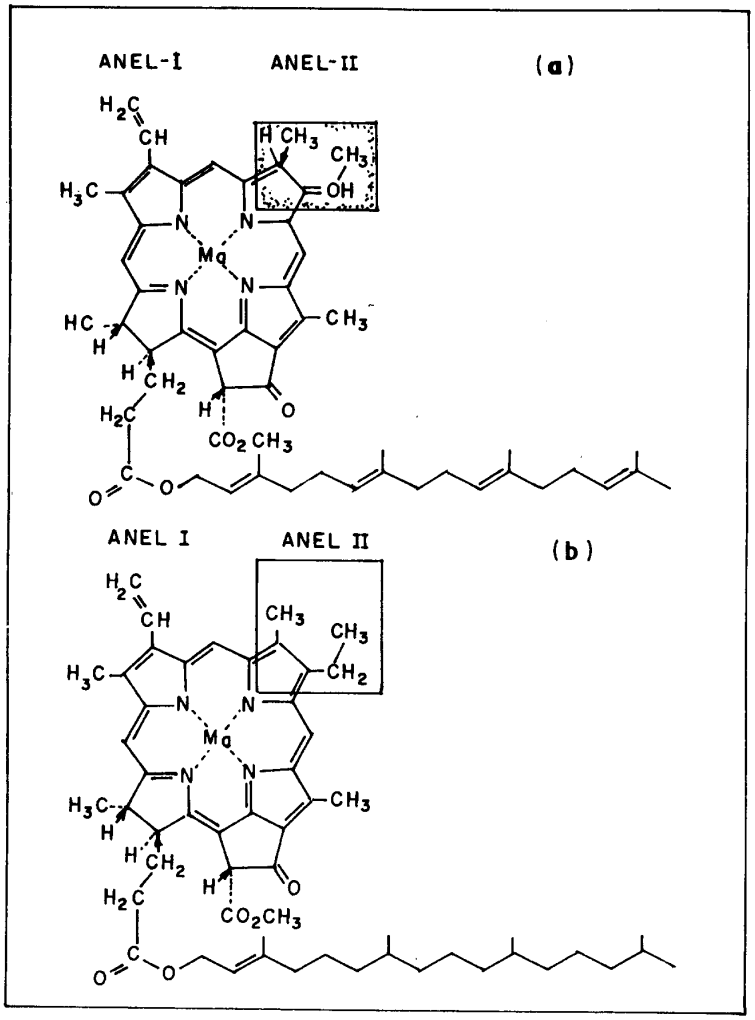


Figura 10.3. Comparação entre as estruturas químicas: (a) Bacterioclorofila "g" e (b) Bacterioclorofila "a"

As bactérias fototróficas também apresentam **pigmentos carotenóides** que diferem entre as púrpuras e verdes. A coloração característica dos florescimentos de púrpuras não é usualmente púrpura, mas marrom, cor de rosa, vermelho amarronzada, violeta-púrpura ou marrom alaranjada; bem como das verdes, que pode ser além de verde, marrom ou laranja, devido a presença dos carotenóides. Assim, a cor não é um bom critério para usar na identificação de bactérias verdes ou púrpuras. Na Tabela 10.2 estão descritas as cinco classes de carotenóides conhecidas e as respectivas colorações das suspensões celulares em condições de crescimento fotossintético.

As bacterioclorofilas e carotenóides das fototróficas estão localizados em membranas intracitoplasmáticas distintas morfologicamente. Nas púrpuras, os pigmentos fotossintéticos são parte de elaborado sistema de membranas interno, provavelmente originado da membrana citoplasmática. Em função da organização estrutural dessas membranas, podem ser encontradas nas seguintes formas:

(1) vesículas, designadas como cromatóforos, presentes em espécies de *Rhodopseudomonas, Rhodospirillum rubrum, Chromatium* e *Rhodobacter sphaeroides*;
(2) invaginações irregulares da membrana, típica de *Rhodocyclus tenuis* e *R. gelatinosus*;
(3) membrana disposta em arranjo de placas planas e curtas, angulares a membrana citoplasmática e característica de espécies como *Rhodospirillum molischianum*;
(4) lamelas emparelhadas (tilacóides), paralelas à membrana citoplasmática, presentes em espécies de *Rhodopseudomonas palustris e R. viridis*, *Rhodomicrobium vannielli*) e *Ectothiorhodospira* sp.;
(5) na forma de tubos redondos, encontrados somente na sulfubactéria púrpura *Thiocapsa pfennigii*.

Exceções as morfologias descritas anteriormente são encontradas em *Rhodospirillum tenue* e *Rhodopseudomonas gelatinosa,* com sistema fotossintético localizado na membrana citoplasmática, portanto não contendo cromatóforos e nem membranas intracitoplasmáticas.

Nas bactérias verdes, o aparelho fotossintético é morfologicamente diferente; a Bcl "a" e os componentes da cadeia fotossintética de transporte de elétrons estão localizados na membrana citoplasmática, que ao contrário das púrpuras, não se encontra diferenciada no interior da célula. A maioria das bacterioclorofilas, (c, d, e c_s) dependendo da espécie, está presente no interior de estruturas de forma cilíndrica, chamadas clorossomos ou vesículas de clorobium ligadas a membrana citoplasmática através da região basal.

As heliobactérias não apresentam membranas internas e nem clorossomos. Neste caso, a bacterioclorofila provavelmente está associada a membrana citoplasmática. Na Figura 10.4 tem-se diagrama das morfologias das membranas fotossintéticas observadas em bactérias fototróficas anoxigênicas.

Tabela 10.2. Pigmentos carotenóides em bactérias fototróficas.

Grupo carotenóide	Principais pigmentos	Distribuição das bactérias	Coloração das células sob crescimento fotossintético
1. Espiroloxantina	licopeno, rodopina, espiriloxantina	púrpuras	vermelho, marrom e laranja
2. Rodopinal	licopenal, rodopinal	púrpuras	púrpura e violeta-púrpura
3. Espiriloxantina alternativa	esferoideno, esferoidenone, neurosporene e derivados	púrpuras e verdes (neurosporene)	marrom, marrom-amarelado, verde amarelado
4. Oquenone	oquenone, metoxilado	púrpura	vermelho púrpura
5. Isorenierateno	carotenos, isorenierateno, clorobacteno	verdes e púrpuras (*Rhodomicrobium* sp, caroteno	verde, marrom e laranja

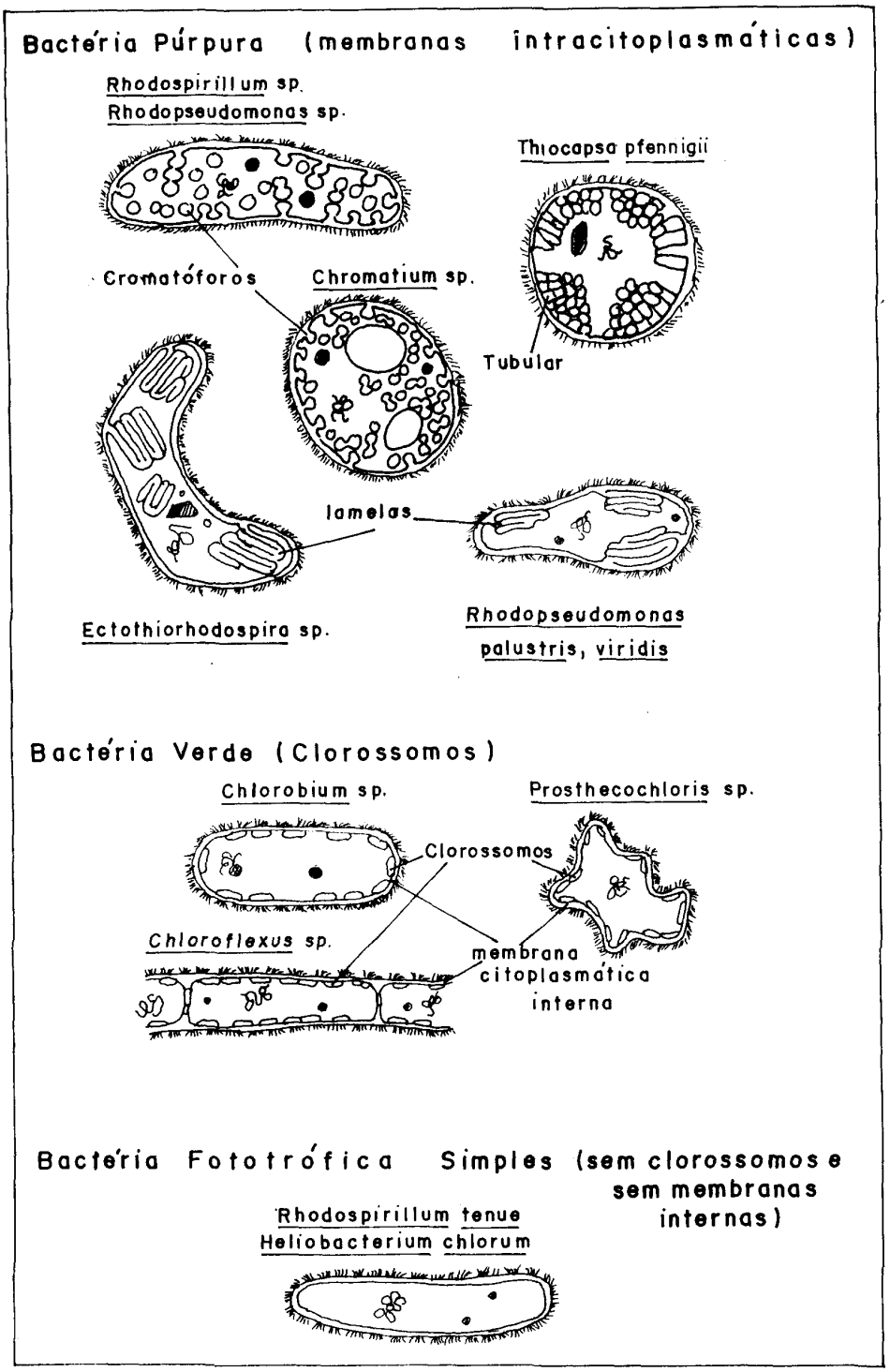


Figura 10.4. Diagrama morfológico do aparelho fotossintético de bactérias fototróficas anoxigênicas.

AULA PRÁTICA

1. Coletar com alça de platina amostra de biomassa vermelha da coluna de Winogradsky;
2. Fazer esfregaço na lâmina de vidro, colocar 1 gota de água e cobrir com lamínula. Fazer observação em microscopia ótica de luz comum em 1.000 vezes com óleo de imersão;
3. Coletar outra amostra e transferir para frasco de vidro, colocar 5 mL de metanol e deixar no escuro por 30 minutos.
4. Centrifugar e transferir o sobrenadante para cubeta de vidro e proceder a leitura em 700 e 800 nm.

BIBLIOGRAFIA

Brock, T. D. & Madigan, M. T. Biology of Microrganisms, New Jersey, Prentice Hall, 1991, 835p.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock Biology of Microorganisms, 8th, 986p., 1997.

Varesche, M. B. A. Estudo com bactérias fototróficas anoxigênicas: enriquecimento, isolamento, caracterização nutricional e cinética de crescimento. Tese do Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento da EESC USP, 363p., 1997.

ANOTÇÕES