

MICROBIOLOGIA

AULAS PRÁTICAS PARA A ENGENHARIA AMBIENTAL



Anderson Gomes

2013

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
ATIVIDADE 1 - NORMAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO MICROBIOLOGIA	2
ATIVIDADE 2 - TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	4
ATIVIDADE 3 - O MICROSCÓPIO ÓPTICO	7
ATIVIDADE 4 - UTILIZAÇÃO DA COLUNA DE WINOGRADSKY PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA MICROBIOTA DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS	10
ATIVIDADE 5 - OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS	13
ATIVIDADE 6 - OBSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS	17
ATIVIDADE 7 - DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES EM ÁGUA PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE	22
ATIVIDADE 8 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABOLICA BACTERIANA ATRAVÉS DO ENSAIO DE RESPIROMETRIA	25
ATIVIDADE 9 - ANÁLISE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO BACTERIANO	29
REFERÊNCIAS	34

MICROBIOLOGIA APLICADA A ENGENHARIA AMBIENTAL

A microbiologia ambiental é a ciência que estuda as interações dos microrganismos com os fatores ambientais. Focando o uso do conhecimento das interações dos microrganismos e o ambiente com a finalidade de trazer benefícios à sociedade. Ela estuda a interação entre os microrganismos com o solo, a água e o ar. Nesse ponto de vista, fica evidente que a atividade microbiana exerce um papel muito importante para a manutenção das outras formas de vida, tanto por seu papel na manutenção dos ecossistemas, atuando na ciclagem de nutrientes, como agentes decompositores, fazendo com que os nutrientes presentes no solo fiquem disponíveis para os outros seres vivos.

A microbiologia ambiental também estuda a ação de microrganismos indicadores da qualidade ambiental, bactérias que atuam no processo de corrosão e o estudo de microrganismos na biotecnologia.

NORMAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO MICROBIOLOGIA

As aulas práticas têm como objetivo complementar o conhecimento obtido em sala de aula, utilizando as metodologias utilizadas no laboratório, pois a palavra “laboratório” significa *labor* = trabalho + *oratorium* = local de reflexão. Portanto, laboratório refere-se a um local de trabalho e concentração, não necessariamente perigoso, desde que sejam tomadas certas precauções.

Nas aulas práticas de microbiologia serão utilizados vários grupos de microrganismos como: bactérias e fungos, alguns dos quais poderão ter um potencial patogênico. Para evitar que haja contaminações, seja para o experimento, seja para o executante da tarefa, deve ser seguido um conjunto de regras de modo a evitar qualquer tipo de contaminações.

- Não brinque durante o trabalho nem distraia seu colega. Evite conversas e sair de seu lugar desnecessariamente. Concentre-se no que estiver fazendo.
- Não fumar, não comer e nem levar à boca qualquer objeto. No laboratório de microbiologia trabalha-se com microrganismos potencialmente patogênicos, devendo-se ter sempre cuidado para evitar uma possível contaminação.
- Na bancada de trabalho não deve haver acúmulo de objetos, nela permanecendo apenas os materiais indispensáveis para o experimento em execução, além do roteiro e caneta ou lápis para as devidas anotações. Todo material do aluno deverá ficar nas estantes que se encontram nos laboratórios.
- Manter o bico de gás aceso somente quando necessário
- Use roupas adequadas para o trabalho que estiver realizando. O uso do jaleco, de mangas longas e preferencialmente de algodão, calças compridas e calçados fechados.
- Vestir o jaleco sempre na entrada do laboratório, distante das bancadas.
- Cabelos compridos devem estar sempre presos.
- Não use lentes de contato no interior do laboratório.
- Comunique ao seu professor qualquer acidente ocorrido. Sempre que houver algum acidente como quebra de tubos ou placas com microrganismos, contato com material

contaminado, etc. você deve sempre avisar seu professor ou monitor para que ele tome providências adequadas e imediatas.

- Antes de iniciar e após o experimento prático, lavar as mãos com água e sabão e posteriormente álcool 70%.
- Os tampões de algodão ou roscas dos frascos não podem ser largados nem colocados sobre nenhuma superfície; devem permanecer na mão do operador, entre o dedo mínimo e a palma da mão durante todo o procedimento.
- Durante as manipulações, as superfícies internas estéreis das placas de Petri devem entrar em contato com o ar o menor tempo possível;
- As partes estéreis de alças ou pipetas que entrarão em contato com as culturas ou com frascos estéreis não podem ser tocadas nem entrar em contato com outras superfícies não estéreis como, por exemplo, panos, superfície da bancada, paredes externas de placas ou tubos, etc.
- Terminado o trabalho prático, deixar a bancada em ordem.

ATIVIDADE 2

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

2.1 Equipamentos e Materiais Usuais em Laboratório

Os principais equipamentos necessários para a execução das práticas existentes neste manual, além do microscópio são:

Agitador orbital: para homogeneização de culturas em erlenmeyer.

Agitador vortex: homogeneização de tubos de cultura.

Agulha de platina: fio reto utilizado para semear em meio sólido em profundidade.

Alça de platina: fio moldado em círculo para semear em meio sólido e superfície.

Autoclave: esterilização de materiais e meio de cultura.

Balança semi-analítica: pesagens no preparo de soluções e meios de cultura.

Banho-maria: aquecimento e preparo de soluções e meios de cultura.

Bomba de vácuo: associada ao sistema de filtração, utilizada para filtrar soluções e amostras.

Cabo de Kole: haste com cabo isolante destinada a sustentação de alças ou agulhas de platina.

Destilador/deionizador de água: para a obtenção de água com qualidade para uso em laboratório.

Estufa de secagem: esterilização e secagem de vidrarias.

Estufa incubadora: com temperatura ajustável, necessária para manter um ambiente com temperatura controlada para o desenvolvimento dos microrganismos.

pHmetro: verificação e ajuste do pH das soluções, amostras e meios de cultura.

Placas de Petri: caixas redondas de vidro, contendo tampas rasas, destinadas a conter meio de cultura sólido.

Tubos de cultura: destinados ao cultivo de microrganismos.

Tubos de Durham: pequenos tubos cilíndricos que são colocados invertidos em tubos de cultura, destinado a verificar se a cultura libera gás.

2.2 - Utilização do Bico de Bunsen

O Bico de Bunsen visa flambar todo material a ser utilizado no laboratório e propiciar um ambiente asséptico ao redor do material que você manuseia. Deve-se regulá-lo com a chama azulada (oxidante) e mantê-la sempre a sua frente (Figura 2.1). Trabalhar com extremo cuidado para evitar acidentes.



Figura 2.1 – Bico de Bunsen com a chama oxidante (azul)

- **Flambagem da alça ou agulha bacteriológica:** colocar o instrumento sobre a chama, numa inclinação aproximada de 45° e nunca em posição horizontal para não esterilizar só a porção final e sim toda a alça. Deve ser flambada até o rubor, antes e após cada experimento, elas são flambadas para evitar resultados indesejáveis ao seu estudo, pois microrganismos podem estar assentados sobre o material.
- **Flambagem de tubos de cultura:** para a abertura de tubos de cultura, segure o tubo com a mão esquerda e retire o tampão com os dedos mínimo e anelar da mão direita, flambando a boca do tubo de cultura. Com os dedos médios, indicador e polegar, manuseia a alça de platina ou a pipeta no raio de ação da chama, evitando assim possíveis contaminações.
- **Flambagem de placa de petri:** segure a placa de petri com a tampa para baixo com a mão esquerda. Flambe a parte externa da placa e mantendo-a sob o raio de ação da chama, abra levemente a placa de petri, e com a mão direita, faça a semeadura ou retire a amostra.

Todos os frascos abertos devem ter suas “bocas” flambadas imediatamente; eles devem ser mantidos abertos ao redor do bico de Bunsen, na posição mais horizontal possível e deve

ter sua “boca” novamente flambada antes de ser fechado. Quando você flamba o tubo, o calor cria uma corrente de convecção, que força o ar para fora, impedindo a entrada de contaminantes.

2.3- Técnicas de Semeadura

- a) **Semeadura em placas de petri pela técnica de esgotamento:** A semeadura em placa através da técnica de esgotamento de um material contido numa alça, começa num dos quadrantes da placa com movimentos de vai e vem. Gire a placa 90° e repita esses movimentos atingindo apenas um dos quadrantes. Gire novamente a placa, e repita o procedimento anterior. No 4º quadrante da placa faça um zigue-zague largo. Com isso você obterá colônias isoladas. Figura 2.2.



Figura 2.2 – Semeadura em Placa

- b) **Semeadura em profundidade, em tubos:** semeie o material contido em uma agulha fazendo picadas até o fundo do tubo, com isso haverá o crescimento de microrganismos em condições de anaerobiose no fundo do tubo. Figura 2.3.

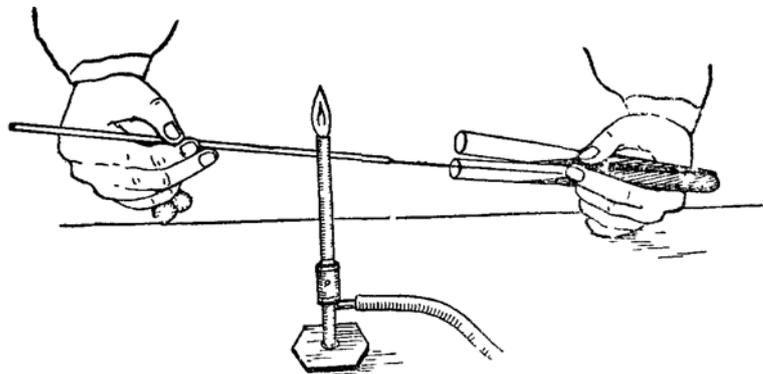


Figura 2.3 – Semeadura em Tubos

ATIVIDADE 3

O MICROSCÓPIO ÓPTICO

3.1 – INTRODUÇÃO

Quase todos os organismos unicelulares são invisíveis a olho nu, por isso é necessário um instrumento para observa-los, o microscópio. O uso deste dispositivo é indispensável num laboratório de microbiologia no estudo da estrutura, morfologia e fisiologia dos microrganismos em laboratório.

3.2 - PARTES CONSTITUINTES DO MICROSCÓPIO

Um microscópio está dividido em duas partes: o sistema óptico e mecânico e as principais partes estão identificadas na figura 3.1:

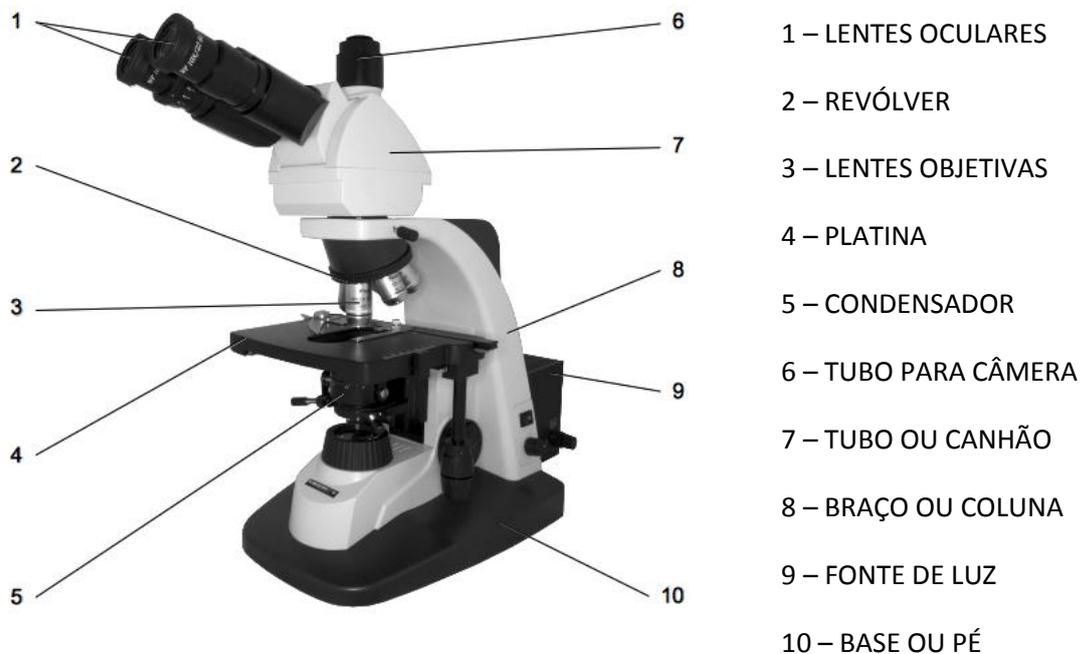


Figura 3.1 – Semeadura em Placa

Lentes Oculares: lentes as quais o observador olha a amostra. Fornecem um poder de aumento de 10x a 20x.

Revólver: sustenta as lentes objetivas e pode ser girada para mudar o aumento.

Lentes objetivas: lentes que se aproximam da amostra, há três ou quatro lentes objetivas em um microscópio, consistindo de poderes de aumento de 4x, 10x, 40x e 100x.

Platina: é a plataforma plana que suporta a lâmina sendo analisada.

Condensador: lente a qual concentra a luz sobre a amostra analisada

Tubo para câmera: local ao qual se destina a acoplagem de câmeras em microscópios trinoculares.

Tubo ou canhão: Suporta a lente ocular na extremidade superior

Braço ou coluna: fixo à base, serve de suporte aos outros elementos e suporta o microscópio quando carregado.

Fonte de luz: projeta luz para cima através do diafragma, lâmina e lentes.

Base ou pé: suporta o microscópio.

Parafuso Macrométrico: engrenagem que suporta o tubo e permite a sua deslocação a da platina. É indispensável para fazer a focagem.

Parafuso Micrométrico: imprime ao tubo ou à platina movimentos de amplitude muito reduzida, completando a focagem. Permite explorar a profundidade de campo do microscópio.

3.3- TÉCNICA DE FOCALIZAÇÃO DO MICROSCÓPIO

- a) Com a amostra a ser analisada voltada para a parte superior, colocar a lâmina sobre a platina, tomando o cuidado de que a parte a ser examinada esteja bem no centro;
- b) Ajustar a iluminação de forma a que passe maior quantidade possível de luz através da amostra;
- c) Colocar a objetiva de menor aumento e abaixar o canhão utilizando o parafuso macrométrico até que a lente esteja a aproximadamente 0,5 cm da lâmina. Nunca efetuar esta operação olhando pela ocular;
- d) Olhar pela ocular e levantar levemente o canhão até obter uma focalização grosseira.
- e) Após focalizar grosseiramente, utilizar o parafuso micrométrico para a focalização;

- f) Acertar a quantidade de luz, movimentando o diafragma. Nunca movimentar o condensador para baixo para diminuir a quantidade de luz. O condensador deve estar sempre em posição elevada;
- g) Reajustar a focalização com o parafuso micrométrico e a iluminação com o diafragma.
- h) Se necessário um aumento maior, girar o revolver para utilizar a objetiva de maior aumento.
- i) Para utilizar a objetiva 100X, é necessária a colocação de uma gota de óleo sobre a lâmina depois da perfeita focalização com as objetivas de aumento 10X e 40X. Observando lateralmente, girar o revolver até encaixar a objetiva de aumento 100X, ficando esta imersa no óleo e sem que a lente toque na lâmina. A seguir, reajustar o foco com o parafuso micrométrico e a iluminação.

Nota: Nunca tentar focalizar diretamente com as objetivas de maior aumento.

3.4- PROCEDIMENTO

- a) pegar uma lâmina previamente preparada, coloca-la sobre a platina do microscópio;
- b) através da técnica previamente descrita, focar a lâmina e anotar as estruturas observadas.

UTILIZAÇÃO DA COLUNA DE WINOGRADSKY PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA MICROBIOTA DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

4.1 - OBJETIVO

Montar uma coluna de Winogradsky e observar o efeito de substâncias químicas no desenvolvimento da microbiota presente na coluna.

4.2 - MATERIAL

- provetas de 1000 mL para a montagem da coluna;
- béquer de 250 mL;
- balança semi-analítica;
- papel indicador de pH;
- soluções de NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M;
- Reagentes: CMC (carboxi-metil-celulose), Na₂SO₄ (sulfato de sódio), Na₂CO₃ (carbonato de sódio), K₂PO₄ (fosfato de potássio), (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio), CaSO₄ (sulfato de cálcio);
- amostra de sedimento e água de rio ou lago;
- substância química em teste.

4.3 – FUNDAMENTO DA PRÁTICA

A coluna de Winogradsky consiste de um ecossistema modelo usado no estudo dos microrganismos presentes na água e sedimentos, no qual irá promover o desenvolvimento destes organismos em ambientes controlados. A altura da coluna permite a estratificação dos microrganismos presentes em função da necessidade de oxigênio dos mesmos, pois irá

formar zonas aeróbias (superfície), microaerofílicas e anóxicas (nas camadas subsuperficiais) e anaeróbias (fundo, junto com o sedimento). A coluna será exposta à luz solar, de forma que haja o desenvolvimento de bactérias fotossintetizante às diferentes camadas do sedimento. Para que haja o desenvolvimento dos microrganismos, o sedimento será enriquecido com uma fonte de carbono orgânico (CMC), sulfatos (Na_2SO_4) e amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), assim permitindo o desenvolvimento de várias populações heterotróficas e fotoautotróficas. (figura 5.1)

4.4- PROCEDIMENTO

- c) Coletar cerca de 1 kg de sedimento e 10 L da amostra da água de rio ou lago. Levar para o laboratório. Esta coleta deverá ser feita na margem, tomando cuidado para não se ferir na coleta, e nunca ir coletar sozinho.
- d) Pesar 100 g do sedimento coletado dentro de um béquer de 250mL e adicionar 4,5 g de Na_2SO_4 , 1 g de Na_2CO_3 , 1 g $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5,0 g de CMC , 1 g CaSO_4 .
- e) Homogeneizar bem e transferir esta mistura para uma proveta de 1000mL e prensá-la com o auxílio de uma vareta ou uma espátula.
- f) Adicionar cuidadosamente a água do lago/rio, evitando ao máximo perturbar a superfície do sedimento. Encher até a marca de 1000 mL.
- g) Medir o pH com papel indicador e, se necessário ajustá-lo para um valor próximo de 7 utilizando soluções de HCl 1M ou de NaOH 1M.
- h) Confeccionar outra coluna repetindo os passos **b** a **e**, porém adicionando a substância a ser pesquisada (metal pesado, composto orgânico, esgoto sanitário ou industrial, etc.) numa concentração conhecida. Se necessário, confeccionar mais colunas para variações de concentração ou pesquisa de várias substâncias.
- i) Cobrir as colunas com uma tela de nylon fina e colocá-la num local onde receba bastante luz solar, figura 4.1.
- j) Semanalmente acompanhar o desenvolvimento das colônias formadas nas colunas e anotar as diferenças entre as colunas sem e com o contaminante. Procurar interpretar os resultados obtidos tendo em conta a diversidade metabólica que caracteriza os microrganismos.

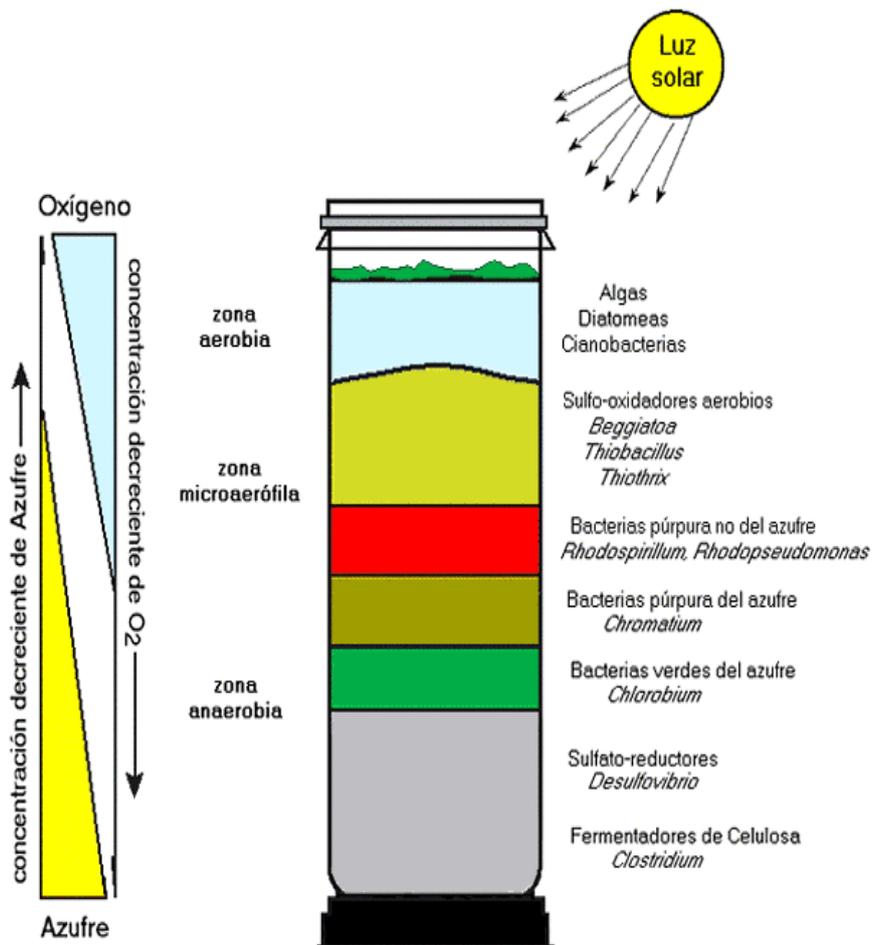


Figura 4.1 - Desenvolvimento da comunidade microbiana em coluna de Winogradsky.
 Fonte: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBiodiversidad.htm>.

ATIVIDADE 5

OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS

5.1 - OBJETIVO

Familiarizar-se com as técnicas básicas de para obtenção de culturas puras, executando rotinas de plaqueamento, tais como estrias em placas e plaqueamento em mistura.

5.2 - MATERIAL

- Incubadora bacteriológica;
- placas de petri com ágar nutriente e tubos de ensaio com caldo nutriente;
- alças de platina;
- bico de Bunsen;
- amostra em teste.

5.3 – FUNDAMENTO DA PRÁTICA

Semear ou inocular significa introduzir artificialmente uma quantidade de amostra (inoculo) em um meio de cultura adequado, com a finalidade de iniciar um cultivo microbiano, onde após a inoculação, o meio de cultura é incubado a uma temperatura adequada para o crescimento. Os microrganismos necessitam de nutrientes apropriados para se desenvolver no meio ambiente. Assim se queremos cultivar e manter microrganismos vivos em laboratório, necessitamos de coloca-los em meios de cultura, contendo os nutrientes apropriados para o seu crescimento. Além dos nutrientes, é necessário que as condições de pH, disponibilidade de oxigênio, pressão osmótica estejam adequados.

Na preparação dos meios e na manutenção das culturas de microrganismos é muito importante observar as condições de assepsia, para evitar contaminações com outros microrganismos.

Os meios utilizados no isolamento das culturas são divididos em meios sólidos, aqueles que contêm ágar na sua composição e meios líquidos, sem ágar. Ambos os meios são preparados com água destilada, aquecidos até que se dissolvam completamente e posteriormente esterilizados por autoclavagem a 121°C.

Nos meios sólidos o crescimento microbiano para pela exaustão de nutrientes, devendo ser necessário a transferência das colônias para um novo meio. No entanto estes meios permitem a individualização das colônias. Os meios líquidos permitem uma melhor difusão dos nutrientes, mas não o isolamento de colônias, permitindo assim a proliferação dos microrganismos.

Quanto à presença de nutrientes, os meios de cultura dividem-se:

- a) **meios nutritivos gerais:** contendo elementos minerais e metabólitos orgânicos. Ex. Agar Nutriente, Caldo Nutriente
- b) **meios enriquecidos:** contendo produtos biológicos (sangue, soro), vitaminas. Ex: Agar Sangue, meio geral não selectivo.
- c) **meios complexos:** contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de um determinado microrganismo, mas não se conhecem as quantidades exatas de todos os componentes.
- d) **meios definidos:** aqueles em que se sabe a concentração exata dos seus componentes. A composição destes meios varia conforme os microrganismos cultivados.

Os meios de cultura classificam-se ainda em:

- a) **Seletivos:** meios para seleção de determinados grupos de bactérias, os quais contêm substâncias que inibem o crescimento de outras bactérias distintas daquelas que nos interessam (meios sólidos). Ex: Agar MacConkey para coliformes.
- b) **Diferenciais:** para identificação de microrganismos, meios sólidos com a composição química adequada para evidenciar uma característica bioquímica (meios sólidos). Ex: MacConkey Agar para isolamento de coliformes, na água. Neste ágar após 24h a 35°C as colônias de *Escherichia coli* são vermelhas e mucoides, enquanto que as colônias de *Salmonella* e *Shigella* são brancas.
- c) **Indicadores,** meios líquidos, com a mesma função dos diferenciais, servem para evidenciar uma característica bioquímica, mas não para separar as colônias positivas e as negativas.

5.4- PROCEDIMENTO

- a) inspecionar cuidadosamente as placas de petri com ágar nutriente, e tubos de ensaio com caldo nutriente, certificando-se da esterilidade dos meios. Descartar aqueles que se apresentem contaminados;
- b) esterilize a alça de platina no bico de bunsen e transfira assepticamente uma gota da amostra através da alça para a superfície do meio contido na placa, espalhando conforme as técnicas de estria simples ou estrias compostas:
 - **técnica das estrias simples:** espalhe o inóculo contido na alça de platina na parte superior da placa em movimentos ziguezague por toda a superfície da placa, tomando o cuidado para não sobrepor as linhas e nem perfurar o ágar. (figura 5.1)

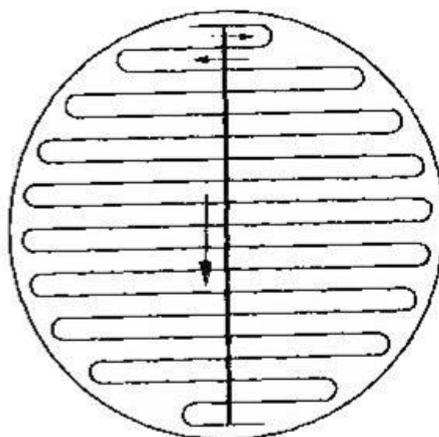


Figura 5.1 – Inoculação pela técnica de estrias simples.

- **técnica das estrias compostas:** divida a placa mentalmente em quatro quadrantes. Esgote a alça de platina no primeiro quadrante em movimentos de ziguezague. Esterilize a alça na chama, gire a placa por 90°, resfrie a alça na superfície do ágar, toque a alça no canto da estria feita anteriormente e refaça os movimentos de ziguezague no quadrante. Flambe novamente a alça e repita a operação no próximo quadrantes. No quarto quadrante da placa faça estrias mais espaçadas a partir do terceiro quadrante e depois espalhe no sentido inverso, tomando o cuidado para que a alça não toque em nenhuma das estrias previamente formadas e não perfure a superfície do ágar. Figura 5.2;

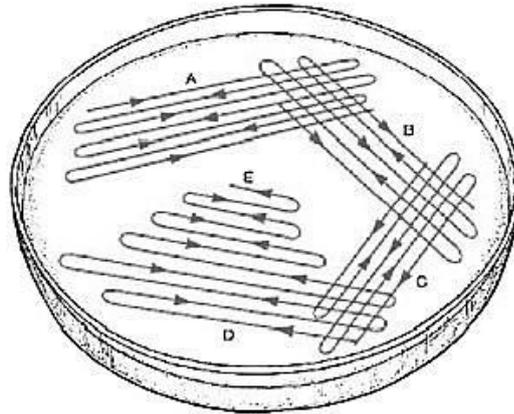


Figura 5.1 – Inoculação pela técnica das estrias compostas.

- c) incube as placas em posição invertida, a 37°C por 24 horas. Observe o crescimento das colônias isoladas.
- d) Após o período de incubação, retire todos os meios da incubadora e transfira as colônias isoladas para o meio de cultura com o caldo nutriente através da alça de platina e incube por 48 h a 37°C, figura 5.3.

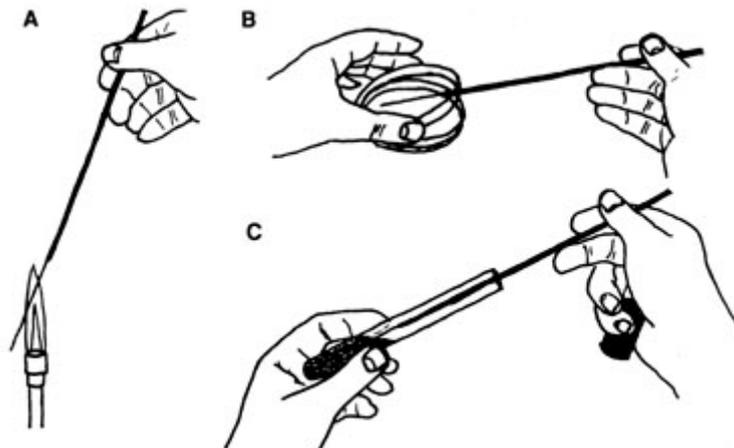


Figura 5.3 – Transferências das colônias isoladas em placa para caldo nutritivo em tubo.

ATIVIDADE 6

OBSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

6.1 - OBJETIVO

Familiarizar-se com as técnicas básicas de identificação de microrganismos através do microscópio óptico.

6.2 - MATERIAL

- microscópio óptico ;
- placas de petri com colônias bacterianas isoladas ou suspensão bactéria em tubo de cultura;
- alças de platina;
- bico de Bunsen;
- lâminas para microscópio;
- lamínulas para microscópio;
- óleo de imersão;
- solução azul de metileno.

6.3 – FUNDAMENTO DA PRÁTICA

A observação microscópica de bactérias tem a função de avaliar a sua morfologia, tamanho, arranjos e outros detalhes que só são possíveis se prepararmos um esfregaço bacteriano, e corarmos as bactérias presente.

Um esfregaço bacteriano representa uma preparação seca de células bacterianas fixas a uma lâmina de vidro, no qual que tenha sido corretamente feito obteremos:

- a) as bactérias espalhadas ao longo da lâmina, numa concentração tal, que lhes permitem ficar adequadamente separadas umas das outras;
- b) não ocorre a perda bacteriana durante as fases de lavagens dos processos de coloração;
- c) não ocorre deformação das bactérias fixadas na placa.

Após a obtenção de um esfregaço bacteriano, a coloração das bactérias torna-se necessária para observação microscópica uma vez que a maioria das bactérias é transparente, não sendo possível distinguir qualquer detalhe da sua morfologia.

Ao utilizar técnicas de coloração é possível aumentar o contraste, e assim identificar características celulares mais facilmente.

A morfologia celular (forma, agrupamento, tamanho e estrutura) fornece informação preciosa na identificação bacteriana. Na preparação dos meios e na manutenção das culturas de microrganismos é muito importante observar as condições de assepsia, para evitar contaminações com outros microrganismos.

6.3.1 Morfologia bacteriana:

As bactérias são classificadas quanto à forma em:

- cocos;
- bacilos;
- vibriões;
- espiroquetas.

E quanto ao agrupamento são classificadas em:

- dois a dois, diplococos ou diplobacilos;
- quatro a quatro, tétrades;
- octetos, sarcinas;
- em cadeia, estreptococos ou estreptobacilos;
- em cacho, estafilococos;
- em paliçada.

A morfologia celular básica das bactérias é mostrada na figura 6.1.

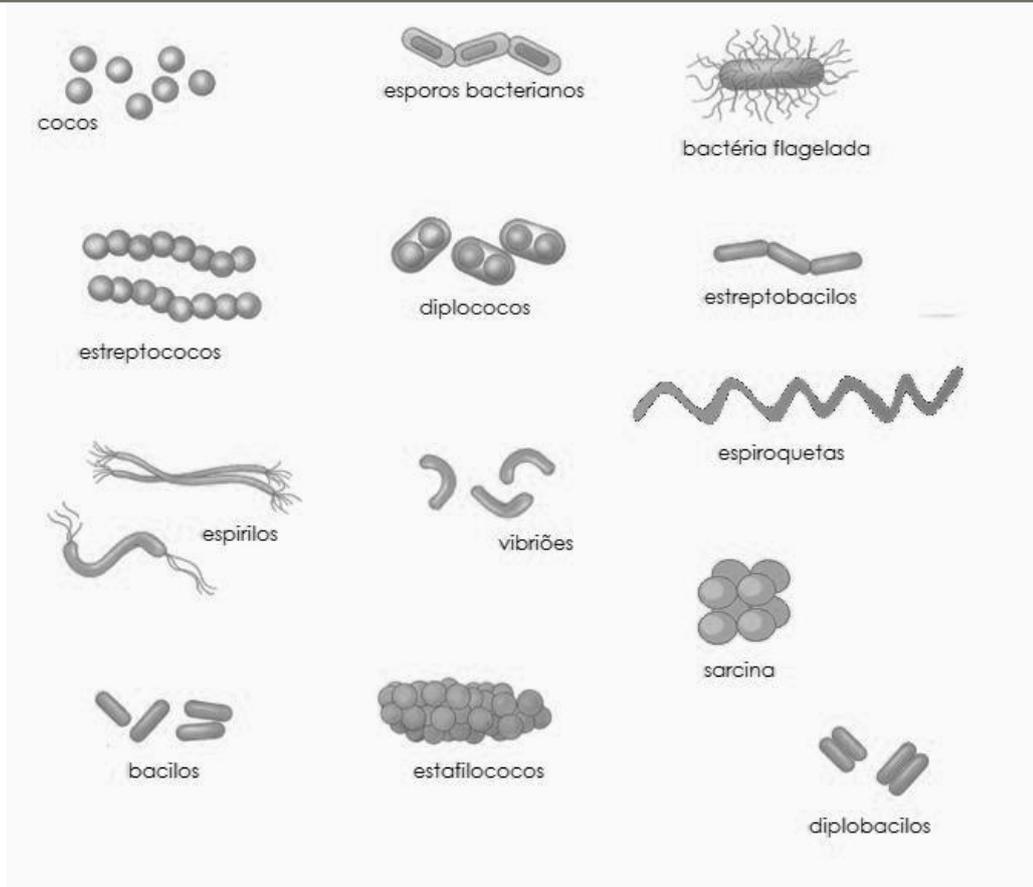


Figura 6.1 – Morfologia básica das bactérias.

6.3.2 Coloração bacteriana:

A coloração bacteriana baseia-se no princípio de que cargas opostas se atraem, enquanto que cargas idênticas se repelem. Uma célula bacteriana transporta carga elétrica. Por exemplo, numa solução aquosa, com pH próximo de 7, a maioria das bactérias apresenta uma carga negativa.

As bactérias assim carregadas atraem moléculas com cargas positivas, e repelem moléculas com cargas negativas. Os corantes utilizados em bacteriologia são constituídos por íons, que podem apresentar carga positiva ou negativa.

Os corantes mais utilizados em microbiologia são os corantes básicos: nos quais o grupo cromóforo está carregado positivamente (Ex: cristal de violeta, safranina, azul de metileno, fucsina básica).

Os corantes ácidos são, normalmente repelidos pelas bactérias devido à carga negativa do seu grupo cromóforo. Este tipo de corante, cora o plano de fundo, deixando as células transparentes (Ex: eosina, rosa de bengala, fucsina ácida).

6.4- PROCEDIMENTO

6.4.1 Esfregaço Bacteriano:

- a) limpar e secar uma lâmina de vidro;
- b) flambar a lâmina e marcar o lado em que vai fazer o esfregaço;
- c) esterilizar a alça de platina na chama do bico de bunsen;
- d) homogeneizar a suspensão bacteriana, destapar o tubo e flambar a boca do tubo;
- e) retirar uma gota da amostra da suspensão através da alça de platina;
- f) flambar o tubo e tapá-lo;
- g) aplicar a amostra contida na alça na superfície da lâmina, espalhando bem em movimentos circulares;
- h) esterilizar a alça;
- i) secar e fixar o esfregaço com o calor da chama, atravessando 3 vezes na chama com lâmina voltada para cima, e em posição oblíqua. (figura 6.2)

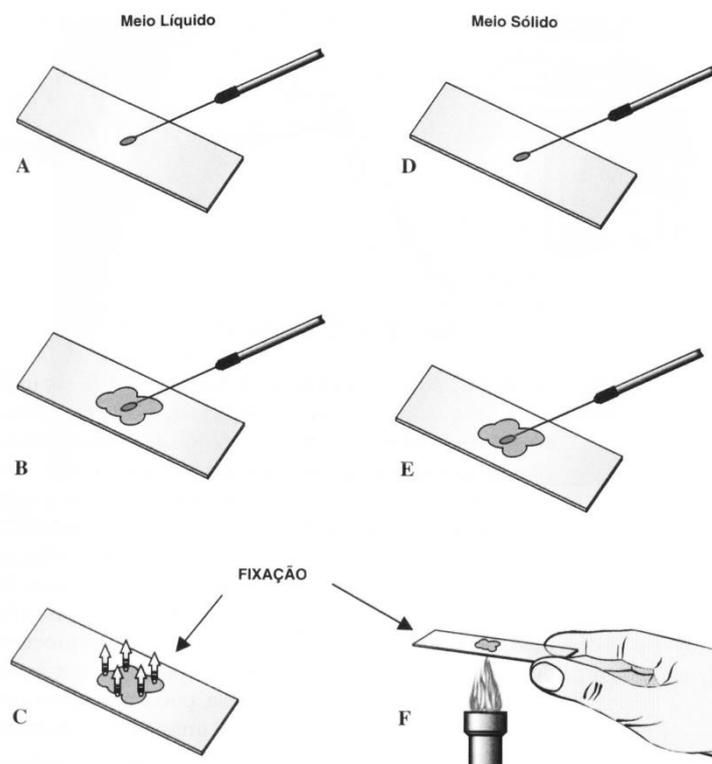


Figura 6.2 – Fixação do esfregaço bacteriano.

6.4.2 Coloração do Esfregaço Bacteriano:

- a) cobrir o esfregaço com o corante azul de metileno;
- b) deixar o corante agir durante 30 segundos
- c) eliminar o excesso de corante lavando o esfregaço com água;
- d) secar o excesso de água (com papel na parte de trás e o restante à chama);
- e) colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço
- f) observar as células ao microscópio com a objetiva de imersão, tendo o cuidado de abrir o diafragma e subir o condensador.

ATIVIDADE 7

DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES EM ÁGUA PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE

7.1 - OBJETIVO

Esta prática tem como objetivo avaliar a qualidade da água através de indicadores de contaminação fecal, as bactérias do tipo coliformes. Dessa forma será possível verificar se a água em questão atende a legislação atual.

7.2 - MATERIAL

- sistema de filtração à vácuo ;
- placas de petri com meios de cultura PCA, EMB e m-Endo
- membrana filtrante estéril de porosidade 0,45 μm ;
- bico de Bunsen;
- bomba de vácuo;
- incubadora;
- pinça de ponta chata;
- contador de colônias.

7.3 – FUNDAMENTO DA PRÁTICA

Os coliformes são bactérias de morfologia bacilar, Gram negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, oxidase negativa, não esporuladas, que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 37°C em um tempo máximo de 48 horas. O grupo compreende os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Os coliformes fecais são bactérias coliformes de origem fecal,

compreendidas no grupo anterior e capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás a 44 °C.

Para a análise de coliformes , o volume de amostra para analisar os coliformes totais e coliformes fecais é de 100 mL. O método utilizado consiste em filtrar a amostra, com uma membrana estéril de porosidade 0,45 µm em um sistema de filtração apropriado, que consiste numa base de apoio ao filtro com adaptação ao kitazato e um copo onde é colocada a amostra, estas duas peças são unidas por uma tenaz. A técnica de membrana filtrante é comumente utilizada para determinar a presença de bactérias totais e coliformes totais/termotolerantes em amostras de água.

Após a filtração a membrana é retirada assepticamente do conjunto e disposta na superfície de um meio de cultura. No caso de determinação de bactérias heterotróficas, a membrana é disposta em meio PCA e incubada a 35° C durante 24 horas. Para determinar a presença de bactérias coliformes termotolerantes, a membrana é disposta nos meios Ágar EMB ou m-ENDO (meios seletivos e diferenciais) e incubada a 44,5° C durante 24 horas

7.4- PROCEDIMENTO

- a) homogeneizar a amostra de água a ser analisada;
- b) próximo a chama do bico de bunsen, montar o conjunto de filtração previamente esterilizado, já contendo a membrana montada no sistema;
- c) adicionar um volume de aproximadamente 50 mL de água destilada estéril no recipiente do conjunto de filtração;
- d) transferir um volume de 100 mL da amostra para o copo do sistema de filtração;
- e) ligar a bomba de vácuo e filtrar todo o volume contido no copo;
- f) desligar o vácuo e desmontar o conjunto de filtração e com auxílio de uma pinça de ponta chata retirar assepticamente a membrana filtrante e depositá-la na superfície do meio de cultura selecionado para o grupo. Cuidado para não deixar bolhas de ar entre a membrana filtrante e a superfície do meio de cultura;
- g) incubar a placa com a membrana à 35°C durante 24 horas (no caso do meio PCA) ou à 44,5°C durante 24 horas no caso dos meios EMB ou ENDO;

h) contar o numero de colônias formadas. Figura 7.1.

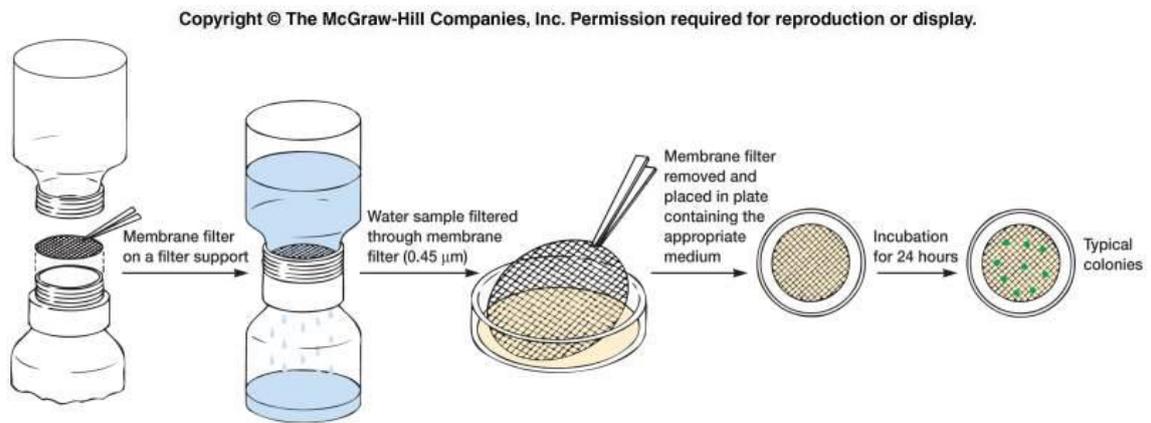


Figura 7.1 – Etapas da análise de coliformes pela técnica de filtração em membrana.

ATIVIDADE 8

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABOLICA BACTERIANA ATRAVÉS DO ENSAIO DE RESPIROMETRIA

8.1 - OBJETIVO

Esta prática tem como objetivo avaliar a taxa de remoção de substrato e crescimento de uma biomassa bacteriana em um ambiente controlado, através do consumo do oxigênio dissolvido presente no meio, ou seja, respirando aerobicamente. Dessa forma permitindo que possa ser demonstrado mecanismos de biorremediação e inibição da atividade microbiana.

8.2 - MATERIAL

- respirômetro composto por agitador magnético, pHmetro, bomba de ar, oxímetro, termômetro e béquer de 1000 mL, montado conforme figura 8.1.



Figura 8.1 – Respirômetro.

- amostra em estudo;

- proveta de 1000 mL ;
- proveta de 100 mL.

8.3– FUNDAMENTO DA PRÁTICA

Num ensaio respirométrico a remoção do substrato e crescimento da biomassa estão relacionados com o consumo do oxigênio dissolvido no meio. Assim, é possível determinar a atividade metabólica de uma cultura mista, relacionando a quantidade de oxigênio consumida por uma biomassa microbiana, ou seja, respirando aerobicamente, e metabolizando o substrato presente.

Partindo destes conceitos, esta técnica é adequada para demonstrar e quantificar atividade de uma biomassa microbiana frente a determinados poluentes, avaliando a sua biodegradabilidade e, a quantidade de oxigênio necessário a sua biodegradação.

O ensaio respirométrico é um bom indicativo para avaliar se o efluente a ser tratado em um sistema biológico é tóxico, pois neste caso, inibirá o consumo de oxigênio pelas bactérias presentes.

Neste ensaio respirométrico foi adotado a técnica de respirogramas, representações gráficas da taxa de consumo de oxigênio dissolvido (TCO), ou taxa de respiração, na unidade de $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, cujo comportamento permite indicar como a biomassa responde à presença de alimento, onde a taxa de respiração é determinada pelo declínio da concentração de OD em função do tempo, de acordo com a Equação :

$$\frac{\Delta y_m}{\Delta t} = -r$$

Em que y_m é a variação da concentração de oxigênio dissolvido (em mg.L^{-1}), e r é a taxa de respiração (em $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

8.4- PROCEDIMENTO

8.4.1 - Preparo do Lodo Para Ensaio:

- a) coletar amostra de um lodo de reator biológico ou sedimento de lago/rio;

- b) transferir uma fração de 800 mL de lodo proveniente coletado e manter sob agitação e aeração constante por um período de 24 horas e sem alimentação, de forma que a maior parte da matéria orgânica solúvel presente seja degradada.

8.4.2 - Determinação da Respiração Endógena:

- a) transferir o lodo preparado para o respirômetro;
- b) aerar até a concentração de oxigênio dissolvido (OD) fique em estabilizada e com concentração superior a 5,0 mg.L⁻¹;
- c) manter o lodo sob agitação constante e interromper a aeração;
- d) acompanhar o declínio do valor de OD por 5 minutos e registrar este valor do consumo de oxigênio dissolvido em carta gráfica em intervalos de 30 segundos, identificando como respiração endógena.

8.4.3 - Determinação da Taxa de Respiração:

- a) mantendo a agitação constante, novamente aerar o lodo do respirômetro por 2 minutos e adicionar 40 mL da substância a ser testada (efluente industrial, esgoto sanitário, líquido percolado, etc.);
- b) desligar a aeração e registrar em carta gráfica em intervalos de 30 segundos o decréscimo da concentração de OD durante o experimento, até que o valor do oxigênio dissolvido atinja os valores encontrados na respiração endógena, ou seja, o substrato presente na amostra teste seja consumido. A figura 8.2 ilustra o gráfico obtido no ensaio;
- c) calcular a taxa de consumo de oxigênio utilizando a seguinte equação:

$$TCO_{(mg.L^{-1}.h^{-1})} = \frac{\Delta y_m}{\Delta t}$$

onde:

y_m = variação da concentração de oxigênio dissolvido (em mg.L⁻¹);

t = intervalo de tempo (em h).

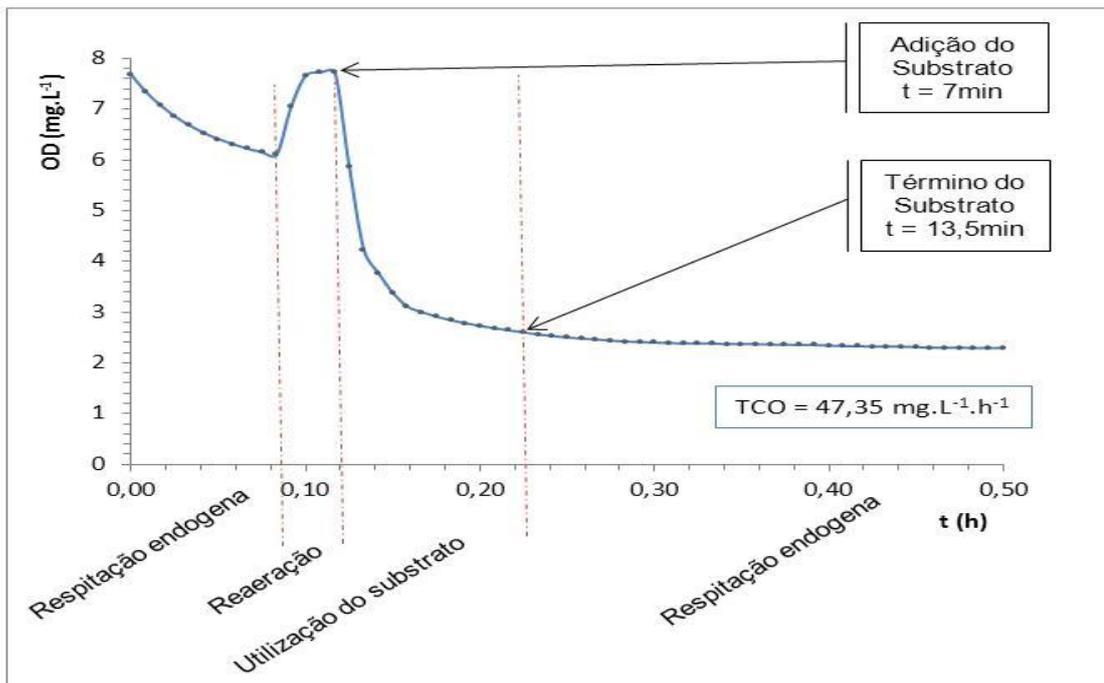


Figura 8.2 – Gráfico de ensaio de respirograma típico obtido com o emprego de método experimental simplificado de TCO

ATIVIDADE 9

ANÁLISE BIOQUÍMICA DO METABOLISMO BACTERIANO

9.1- OBJETIVO

Esta prática tem como objetivo avaliar a atividade bacteriana através de suas reações metabólicas. A investigação das atividades metabólicas das bactérias serve para auxiliar a identificar grupos ou espécies de bactérias ou leveduras através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado microrganismo. Como muitas vezes um determinado microrganismo possui um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica, as provas bioquímicas podem ser utilizadas na prática para a sua caracterização.

Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultura especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento.

9.2- MATERIAL

- alça de platina;
- agulha de platina;
- bico de Bunsen;
- lâminas de vidro;
- incubadora;
- tubo com caldo simples e indicador de andrade e tubo de durhan em seu interior;
- tubo com meio citrato em azul de bromotimol;
- tubo com meio SIM;
- reativo kovacs
- solução de peróxido de hidrogênio 3 a 5%.

9.3– FUNDAMENTO DA PRÁTICA

A investigação das atividades metabólicas das bactérias serve para auxiliar na identificação de grupos ou espécies bacterianas ou leveduras através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação de enzimas específicas do microrganismo. Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultura especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento.

9.3.1 - Fermentação de Carboidratos:

Algumas bactérias são capazes de hidrolizar os carboidratos (dissacarídeos até glicose), e metabolizar a glicose até ácidos (com ou sem liberação de gás) e/ou álcoois.

carboidrato → glicose → piruvato → ácidos, álcoois e gases.

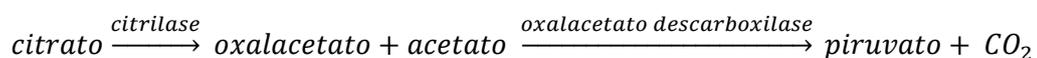
Meio utilizado: meio de cultura indicador que contém: caldo simples + carboidrato + indicador de pH (indicador de Andrade) + tubo de Durhan.

9.3.1.1 Procedimento:

- repicar o microrganismo já isolado para o meio contendo o carboidrato e incubar em estufa a 37° C por 24 horas.
- observar se houve produção de ácidos (viragem da cor do meio) com ou sem produção de gás (formação de bolha no interior do tubo de Durhan).

9.3.2 - Utilização de Citrato como Fonte de Carbono Orgânico:

Muitas bactérias são capazes de utilizar o citrato (sais do ácido cítrico) como fonte de carbono orgânico através das enzimas citratolise e citrilase, gerando como subproduto metabólico o acetato e oxaloacetato, onde este último sendo subsequentemente convertido em piruvato e CO₂, pela enzima oxalacetato descarboxilase.



O piruvato é utilizado para o metabolismo celular e o CO₂ é liberado no meio de cultura. O CO₂ liberado reage então com o sódio (proveniente do sal citrato de sódio incorporado na composição do meio de cultura), formando carbonato de sódio, que promove a viragem da cor do meio, devido a alcalinização.

Meio utilizado: Citrato de Sódio + H₂O + Indicador de pH (azul de bromotimol).

O pH final do meio após preparo: 6.8 .

Indicador de pH: azul de bromotimol: verde em meio ligeiramente ácido (6.8) e azul em pH acima de 7,6.

9.3.2.1 Procedimento:

- a. repicar o microrganismo já isolado no meio do citrato e incubar na estufa a 37° C por 24 horas;
- b. observar se o meio de cultura tornou-se azul, teste positivo, a bactéria utilizou o citrato liberando CO₂; teste negativo: meio inalterado (verde).

9.3.3 - Metabolismo de Proteínas:

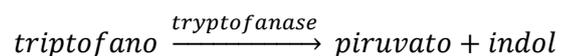
A decomposição de proteínas leva à produção de substâncias com odor pungente como o H₂S, Indol e escatol e etc.

Neste experimento, observaremos a utilização ou não de certos aminoácidos pelas bactérias (necessários ao seu metabolismo), através da detecção da presença de substâncias pútridas.

Meio de cultura utilizado: Meio SIM. (S=sulfeto; I=indol; M=motilidade).

Composição: peptona (proteína que serve como fonte de triptofano e cistina), sal de metal pesado (sal de ferro ou chumbo), água e ágar.

- a) **Produção de Indol:** degradação do triptofano pela enzima tryptofanase produzida pela bactéria, produzindo piruvato e indol.

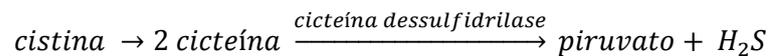


piruvato: utilizado pelo metabolismo bacteriano;

indol: liberado no meio de cultura após a incubação. Adicionar 3 a 5 gotas do reativo de Kovacs (solução de paradimetilaminobenzaldeído), se houver presença de indol, gera um anel vermelho um anel vermelho (composto denominado rosindol)

Resultado do teste: indol positivo, anel vermelho; indol negativo, anel amarelo.

b) **Produção de H₂S**: pela degradação da cistina (aminoácido que contém enxofre) pela enzima cisteína dessulfidrilase produzida pela bactéria com a liberação de H₂S, este reage com sais de ferro ou chumbo, dando um precipitado negro.



Resultado do teste: H₂S positivo, precipitado negro; H₂S negativo, sem precipitado.

9.3.3.1 Procedimento:

- semear com agulha de platina até aproximadamente 1/3 do tubo com o meio SIM a bactéria já isolada. Incubar em estufa a 37°C por 24 horas;
- após incubação, adicionar de 3 a 5 gotas do reativo de Kovacs e proceder a leitura.

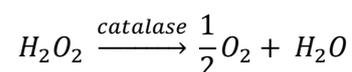
Resultado do teste:

indol = positivo, anel vermelho; indol negativo, anel amarelo;

H₂S = positivo, precipitado negro; H₂S negativo, sem precipitado.

9.3.4 - Produção de Catalase:

A enzima catalase atua sobre a água oxigenada (solução de peróxido de hidrogênio 3 a 5%) desdobrando-a em oxigênio e água.



9.3.4.1 Procedimento:

- colocar uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3-5% numa lâmina;

-
- b. com uma alça de platina, colocar uma porção do crescimento bacteriano sobre a gota. A prova é considerada positiva quando há efervescência devido à liberação do oxigênio.

Resultado do teste:

catalase = positivo, efervescência; negativo, sem efervescência.

REFERÊNCIAS:

GOMES, A.; COSTA-FILHO, A. **Ensaio Respirométrico: Uma Aula Prática para a Avaliação do Metabolismo Bacteriano no Ensino da Microbiologia Ambiental**. In: II Encontro Nacional de Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente – Centro Universitário Plínio Leite (UNIPLI), 2010. Niterói, RJ. Anais. p. 232-242. ISSN: 2179-3417

GOMES, A.; OSORIO, L. S. **Utilização da Coluna de Winogradsky para a Demonstração do Efeito dos Metais Pesados na Microbiota Oxidante de Enxofre em Ambientes Aquáticos: Uma Abordagem Experimental**. Cadernos UniFOA, Volta Redonda - agosto 2011. pp. 21-28. ISSN: 1982-1816

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming**. 2nd Edition, Lewis Publishers, INC., Michigan, USA, 1993. 192p. ISBN: 87371-873-9.

JORGE, O.C. **Microbiologia - atividades práticas** - 2ª edição. São Paulo. Ed.SANTOS, 2008. 300p. ISBN: 8572886958

LACAZ-RUIZ, R. **Manual prático de microbiologia básica**. São Paulo. Ed. EdUSP, 2000. 136p. ISBN: 8531405491

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.P.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo. Prentice Hall, 2004. 608p. ISBN: 85-879-1851-6

OKURA, M.H.; RENDE, J.C. **Microbiologia - roteiros de aulas práticas**. São Paulo. Ed. Tecmedd, 2008. 224p. ISBN: 8599276263

SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. **Microbiologia - manual de aulas práticas**. Florianópolis, Ed. UFSC, 2007. 155p. ISBN: 8532802737

SOARES, M.M.S.R.; RIBEIRO, M.C. **Microbiologia prática roteiro e manual: bactérias e fungos**. Rio de Janeiro. Ed. Atheneu, 2002. 120p. ISBN: 8573792442

SOARES, M.V.; OLIVEIRA, D.M.; FONTES, M.A.S.; SOUZA, M.C.T.; SÁ, P.I.A.; HABIBE, R.C.H.; BARBOSA, R.A.; MARTINS, J.S; FONSECA, W.L.M.S. **Manual de Biossegurança**. Volta Redonda. Ed. UniFOA, 2008. ISBN: 9788560144143