

Micróbios à mostra na Escola

Introdução à Microbiologia

**manual para professores e estudantes
dos ensino básico e secundário**

João Margaça, André Barata,
Amândio Madeira-Lopes e M. Conceição Loureiro-Dias

Junho de 2004

Prefácio

Embora os nossos sentidos nos permitam realizar algumas observações directas do mundo que nos rodeia, o maravilhoso mundo dos micróbios não nos está tão acessível sendo necessárias técnicas auxiliares para a ele acedermos. Neste livro, coligimos um conjunto de metodologias, que foram desenvolvidas com a finalidade de permitirem a observação de micróbios que fazem parte do nosso quotidiano, utilizando, quase exclusivamente, materiais e equipamento disponíveis em qualquer escola. Estas experiências podem realizar-se nas escolas do ensino secundário, e também do ensino básico, com a orientação dos professores, ou mesmo em casa, na cozinha, com pais tão curiosos como os seus filhos, e com o desejo de partilhar estas aventuras.

O desenvolvimento das metodologias, que descrevemos, teve lugar no âmbito do Projecto "Micróbios à mostra na Escola", patrocinado pela Agência Ciência Viva, entre 1999 e 2001, e foi executado no Departamento de Botânica e Engenharia Biológica no Instituto Superior de Agronomia, inicialmente pela Ana Leal, então finalista de Engenharia Agronómica, que teve ainda papel notável na preparação da participação do projecto no Forum Ciência Viva de 1999. Integraram também este projecto a Escola do Ensino Básico, 1º Ciclo, nº 4 de Oeiras, a Escola Básica 2,3 de Prof. António Pereira Coutinho, em Cascais, e a Escola Secundária de Sebastião e Silva em Oeiras. Os protocolos que se foram desenvolvendo iam sendo discutidos com professores e executados por alunos destas escolas. Em função dessa experiência, os protocolos foram otimizados e a sua redacção melhorada. Temos já saudades desses jovens (alguns deles muito jovens mesmo!) e estamos gratos às Professoras Manuela Castro Neves, Luísa Madeira, Dália Abegão, Ana Lopes, Eunice Santos, Isabel Flores, Manuela Venda e Lurdes Caldeira pelas suas sugestões e colaboração.

A opinião pública criou a ideia de que os micróbios são seres perigosos, que provocam doenças e dos quais não gostamos nem de ouvir falar. Pelo contrário, neste livro, pomos à mostra alguns dos micróbios que nos rodeiam e que nos são muito úteis (ou que, pelo menos, não nos prejudicam muito). Lidamos com representantes de cada um dos três domínios presentemente considerados nos seres celulares: a levedura de padeiro (domínio dos eucariontes ou *Eucarya*), as bactérias do iogurte (domínio das eubactérias ou *Bacteria*), e as halobactérias que constituem as manchas vermelhas no bacalhau (domínio das arqueobactérias ou *Archaea*). Incluímos ainda um protocolo que, de maneira simplificada, permite mostrar como fazer e avaliar um antibiograma. Neste caso escolhemos uma bactéria comercializada em cultura pura e liofilizada sob a forma de um medicamento e vários antibióticos disponíveis também como medicamentos.

As experiências, acompanhando o crescimento microbiano, vendo colónias deles à vista desarmada e observando-os ao microscópio, são muito divertidas e também educativas. É que permitem ajudar na distinção entre observações e ideias, frequentemente confundidas nas notícias, consciencializando os jovens para uma participação social de rigor.

1. Apresentação da ciência dos micróbios	4
1.1. Como se faz a ciência: os processos e os métodos científicos	4
1.2. Como se utiliza a Ciência	5
1.3. Conhecimentos básicos sobre os micróbios e os seres vivos em geral	6
1.3.1. Classificação e evolução dos seres vivos	6
1.3.2. Energética	7
1.3.3. Biossíntese	8
1.3.4. Genética, crescimento e multiplicação	8
2. Objectivos Gerais	9
3. Explicação das técnicas utilizadas	9
3.1. Microscópio	9
3.1.1. Utilização	9
3.1.2. Registo de observações microscópicas	11
3.2. Medição de pH	12
3.3. Esterilização no autoclave ou na panela de pressão	13
3.4. Técnicas de assepsia	14
3.5. Isolamento de micróbios	15
3.5.1. Placa de isolamento	16
3.5.2. Placa de individualização	17
3.5.3. Placa de incorporação	19
3.6. Cuidados de manipulação e tratamento do material de vidro	19
4. Trabalhos experimentais	20
4.1. Um eucarionte: a levedura de padeiro	20
4.1.1. Observação microscópica de células de levedura	21
4.1.2. Preparação de meio para leveduras em placas de meio sólido	22
4.1.3. Isolamento de leveduras	22
4.1.4. Observação microscópica e contagem de colónias	23
4.1.5. Observação de ascósporos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
4.1.6. Crescimento de leveduras em sumo de uva	25
4.2. Eubactérias: as bactérias do iogurte	26
4.2.1. Observação microscópica das bactérias do iogurte	26
4.2.2. Preparação de meio para placas para bactérias do iogurte	27
4.2.3. Isolamento de bactérias do iogurte	28
4.3. Arquebactérias: as halobactérias do bacalhau	29
4.3.1. Observação microscópica a partir do bacalhau proteolisado	29
4.3.2. Meio de cultura em placas para halobactérias	30
4.3.3. Isolamento de halobactérias	31
4.4. Resistência de bactérias a antibióticos	32
4.4.1. Meio para antibiogramas	32
4.4.2. Preparação de soluções de antibióticos	33
4.4.3. Preparação do antibiograma	36
5. Sugestões para a adequação da execução dos trabalhos	38
5.1. Ensino Básico	38
5.2. Ensino Secundário	39
6. Avaliação comportamental	39
6.1. Exemplo de exercício, a utilizar no ensino secundário	40
7. Publicações relacionadas para possível consulta	43

1. Apresentação da ciência dos micróbios

1.1. Como se faz a ciência: os processos e os métodos científicos

A parte da Ciência que se dedica ao estudo dos micróbios tem os nomes de Microbiologia ou de Biologia Microbiana. Na elaboração do seu conhecimento, a Microbiologia utiliza os processos vulgares das ciências experimentais, e muitos dos métodos da biologia, da química, da física, e alguns métodos que lhe são específicos.

Os **processos científicos** compreendem processos essencialmente sensoriais ou observacionais e processos essencialmente mentais ou conceptuais.

Os processos sensoriais, a que se chega através dos sentidos (como a visão, a audição, o paladar), correspondem às observações dos fenómenos que, se resultarem de experiências planeadas, podem ainda designar-se por resultados experimentais. Os processos conceptuais correspondem às ideias ou conceitos que resultam da interpretação das observações. São as hipóteses, só viáveis se forem apoiadas pelas observações.

O conhecimento evolui a partir da interacção dos dois tipos de processos, que se desencadeiam mutuamente, e ambos são essenciais para o progresso da ciência e das suas aplicações. O nome apropriado é o de processos científicos, por não haver receitas envolvidas nesta interacção, e não de método científico, como há ainda quem sustente. Métodos são sequências de técnicas (ver abaixo).

Em geral, pode usar-se o termo observação, mesmo para resultados de experiências planeadas, mas deve evitar usar-se o termo resultado para observações simples que não tenham provindo de planeamento experimental. Os conceitos ou ideias são formulações da mente, baseadas ou apoiadas em observações sistematizadas e reproduzíveis. Os conceitos mais simples são as generalizações de observações. Os modelos e as teorias são hipóteses mais elaboradas.

O que não deve usar-se em Ciência são as palavras "facto", "conclusão", "provas", "evidências" usadas pela política, pelo direito, e pela comunicação social. A Ciência é mais modesta, lida com a descrição de observações, que podem apoiar ou refutar a formulação de conceitos, necessariamente provisórios. No jornalismo de divulgação científica encontra-se, por vezes, a afirmação de que "dantes pensava-se ... mas hoje sabe-se ...". Em Ciência, dantes pensava-se ... , hoje pensa-se ..., e daqui a uns anos, ou séculos, pensa-se ..., e não se chega a conclusões, isto é, a saberes definitivos.

As hipóteses e as teorias, por mais bem apoiadas experimentalmente, não passam a factos. O conceito de evolução dos seres vivos é uma teoria, como são teorias, as chamadas leis e os princípios da física, como as leis do movimento ou as teorias da relatividade. Os conceitos científicos têm a ver com probabilidade: por haver fortes apoios experimentais, é mais provável que haja evolução do que não haja. Por exemplo, para o físico Feynman, "é mais provável que os conceitos relativos à existência de discos voadores e do contacto com seres extraterrestres (elaboraões mentais apoiadas em observações casuais, não sistematizadas nem reproduzíveis) sejam mais devidos à irracionalidade dos terrestres do que à racionalidade dos extraterrestres".

As observações descrevem-se com o verbo no passado, enquanto que as hipóteses se formulam com o verbo no presente. “Encontrámos bactérias neste iogurte”, é a descrição duma observação; “as bactérias são os agentes da produção do iogurte”, é a formulação duma hipótese. Esta hipótese é apoiada pelas observações de que se encontraram bactérias num determinado iogurte, e noutra, e noutra, e não se encontraram bactérias num leite, nem noutra, nem noutra, que não se transformou em iogurte. Outras observações consubstanciam esse apoio experimental, como a observação da produção de ácido láctico pelas bactérias do iogurte, obtenção de energia por essas bactérias na transformação da lactose em ácido láctico, etc. A ideia de que “a transformação do leite em iogurte é mediada por bactérias dos géneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*” é uma hipótese com fortes apoios experimentais. Mas não é uma observação e muito menos um facto. A observação correspondente a esta ideia é: “em presença daquelas bactérias, o leite transformou-se em iogurte”.

Métodos são conjuntos sequenciais de técnicas, as receitas que usa a ciência experimental na execução das suas experiências. A técnica de suspender leveduras de padeiro em água, com a técnica de espalhar essa suspensão de células à superfície duma lâmina de vidro, com a técnica de cobrir a suspensão com uma lamela, com a técnica de utilização do microscópio, conjugam-se no método de observação microscópica das células de levedura.

Embora os métodos possam ser alterados, e são-no frequentemente de acordo com os objectivos planeados para as experiências (tal como sucede com as receitas culinárias), os processos da ciência não obedecem a receitas nem a planos pré-estabelecidos: são mais abertos. Os resultados que surgem das experiências podem diferir dos resultados esperados e o observador deve estar atento para descrever as observações dos fenómenos que se manifestam. Deve haver esforço no sentido de que o processo da descrição de observações seja o mais objectivo possível.

1.2. Como se utiliza a Ciência

Podemos entender a utilização da Ciência de três maneiras.

A utilização mais conhecida não é Ciência, mas resulta da aplicação do conhecimento científico: é a tecnologia, como por exemplo a biotecnologia. A fabricação de iogurte, de medicamentos ou de detergentes são actividades tecnológicas, de indústria alimentar, farmacêutica ou doméstica.

Um segundo aspecto da Ciência é a própria actividade científica, o desenvolvimento do conhecimento pelo conhecimento. Utiliza processos e métodos, como os que foram esquematizados acima, e costuma designar-se por ciência básica ou fundamental. É uma actividade cultural, ao nível das actividades artísticas, das literárias de ficção ou doutras, e não tem mais valor, mas também não tem menos valor do que elas. A organização do conhecimento em qualquer área ajuda-nos a estabelecer esquemas mentais, que devem reformular-se sempre que seja necessário.

O terceiro, muito importante aspecto da Ciência, tem a ver com a aplicação da maneira de adquirir o conhecimento científico ao nosso dia-a-dia sensorial e conceptual. É o desenvolvimento e utilização de descrições objectivas e rigorosas, formulação de ideias que as observações apoiem ou refutem, logicamente

explicitadas, e, muito importante, a ênfase na distinção entre as descrições de observações e o que daí resulta: a elaboração mental das ideias. Voltando ao jornalismo, como é que é possível ler, ou ouvir, descrições tão diferentes do mesmo acontecimento, misturadas com a formulação de ideias interpretativas do que foi observado, sem nitidamente mostrar, dizer, separar umas das outras, apartar as observações das ideias? As descrições correctas, objectivas, devem situar-se acima dos interesses, nomeadamente quando se pretende informar. A criação e o desenvolvimento de consciências honestas passa, eventualmente, pela experimentação científica simples, pela descrição de observações, e pela exposição das ideias que as observações sugeriram. Separadamente, distintamente, honestamente!

1.3. Conhecimentos básicos sobre os micróbios e os seres vivos em geral

As generalizações que se seguem traduzem aspectos muito básicos e rudimentares de ideias formuladas sobre os seres vivos, e presentemente apoiadas por muitas observações. Algumas manter-se-ão talvez durante anos, mas outras estão já a ser postas em causa por resultados experimentais recentes, e serão talvez brevemente reformuladas. Embora provisórias, elas são, no entanto, necessárias como mesa de trabalho, suporte mental, das experiências a que nos iremos dedicar.

1.3.1. Classificação e evolução dos seres vivos

Considera-se, presentemente, que existem os seres celulares – constituídos por células – e os seres subcelulares – que têm apenas porções químicas duma célula na sua constituição. São seres subcelulares, por exemplo, os vírus. São seres celulares os animais, as plantas, os fungos, os protozoários, as algas e as bactérias. Às bactérias também se dá o nome de procariontes, seres com um pré-núcleo, ou de protocariontes, que significa seres com um núcleo primitivo; todos os outros organismos são os eucariontes, que significa seres com núcleo bom, por o núcleo das suas células possuir um invólucro. Eucariontes são os animais, as plantas, os fungos, os protozoários e as algas. Estes dois últimos dividem-se, presentemente, por vários reinos.

Consideram-se três domínios de seres celulares (**Fig. 1**) – as Eubactérias (ou *Bacteria*), as Archeobactérias (ou *Archaea*) e os Eucariontes (ou *Eucarya*) – que se definem, essencialmente, em termos moleculares (composição dos ácidos nucleicos – DNA e RNA – e das proteínas). Mas é geralmente possível distinguir, microscopicamente, as células dos Eucariontes, maiores e mais complexas, das células das Eubactérias e das Archeobactérias a cujo conjunto, como vimos, se chama Procariontes.

Há várias observações que apoiam a ideia de que as eubactérias e as archeobactérias constituem dois troncos evolutivos separados embora tivessem tido um antepassado comum. Os eucariontes, por seu lado, terão inicialmente resultado da associação duma archeobactéria com três ou mais eubactérias.

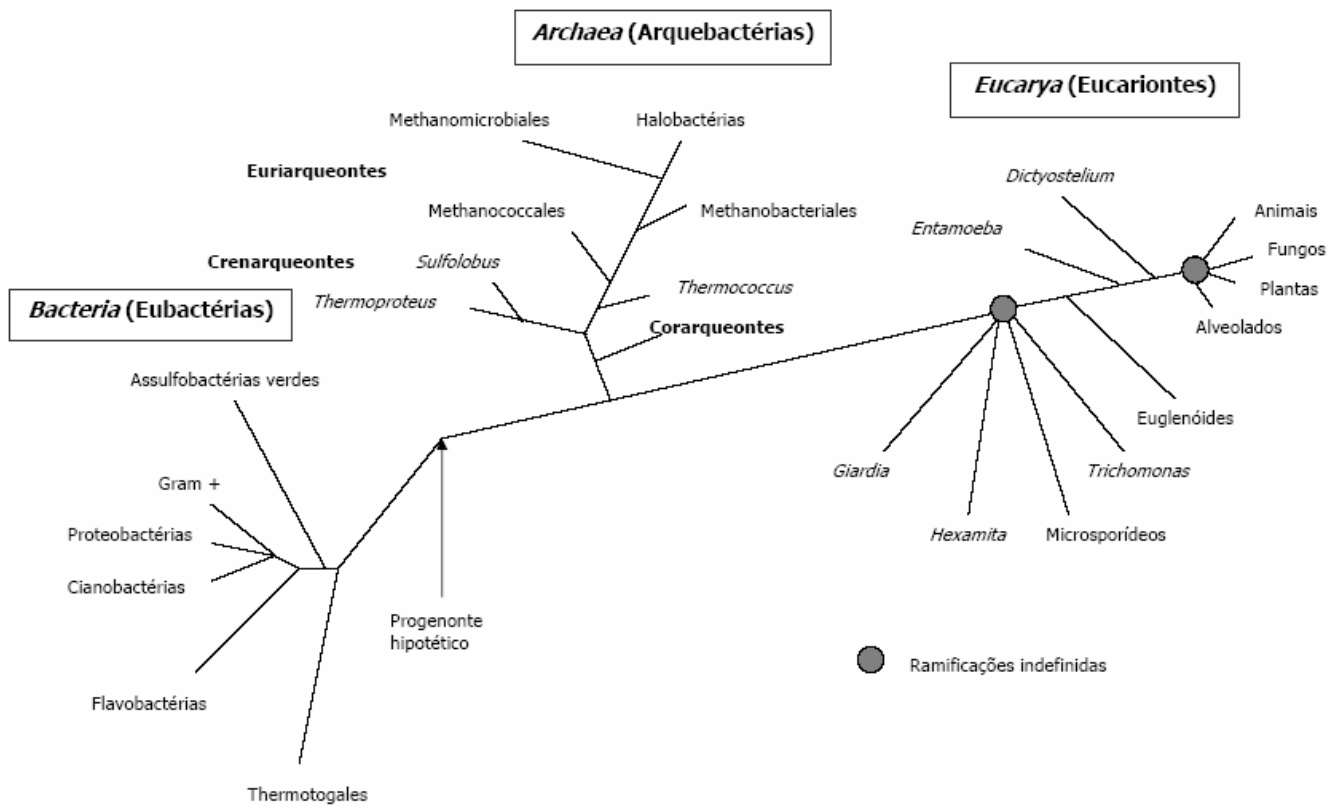


Figura 1. Os três domínios dos seres vivos, presentemente aceites – as Eubactérias, as Arqueobactérias e os Eucariontes – e as suas relações evolutivas. As hipóteses, em que se baseia a construção desta árvore, apoiam-se em muitas observações experimentais, e estão em reformulação constante, à medida que se acrescentam novas observações. Deste modo se vai modificando a árvore.

1.3.2. Energética

Os seres vivos utilizam energia, geralmente sob a forma dum composto químico, o ATP, que as células fabricam de três maneiras distintas: respiração, fotossíntese e fermentação. Na respiração e na fotossíntese, a formação de ATP está associada a membranas das células ou das suas organelas, enquanto que na fermentação a formação do ATP não está associada a membranas. Por outro lado, tanto na respiração como na fermentação a energia provém de substâncias químicas, isto é, a fonte de energia é química, ao passo que na fotossíntese a fonte de energia é luminosa (**Tabela I**).

Os animais, os fungos, os protozoários e muitas bactérias utilizam a respiração ou também a fermentação, ao passo que as plantas, as algas e várias bactérias utilizam essencialmente a fotossíntese.

Tabela I. Comparação entre os três processos energéticos conhecidos dos seres vivos: a respiração, a fotossíntese e a fermentação.

	Origem da energia	Local de formação de ATP
Respiração	composto químico	associado a membranas
Fotossíntese	luz	associado a membranas
Fermentação	composto químico	não-associado a membranas

1.3.3. Biossíntese

Os organismos vivos são constituídos por uma grande quantidade de água – 70 a 90% ou ainda mais – e por vários elementos químicos, componentes dos compostos, que se organizam em estruturas celulares. É o carbono o elemento mais abundante – cerca de 50% da biomassa seca (isto é, com exclusão da água) – e outros elementos importantes são o oxigénio, o azoto, o hidrogénio, o fósforo, o enxofre, o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o cloro e o ferro.

Dos organismos que utilizam substâncias orgânicas como fonte de carbono das suas células, diz-se que fazem heterotrofismo. Dos que utilizam principalmente uma fonte inorgânica, como o dióxido de carbono, CO₂, diz-se que fazem autotrofismo. As plantas, as algas e várias eubactérias fazem autotrofismo associado a fotossíntese, enquanto que várias eubactérias e arqueobactérias fazem autotrofismo associado a respiração. O heterotrofismo está associado a respiração e a fermentação em animais, fungos, protozoários e muitas bactérias, e está associado a fotossíntese em várias eubactérias e várias arqueobactérias (**Tabela II**).

Dentre os organismos a que este manual se dedica:

As bactérias do iogurte (eubactérias) fazem fermentação e heterotrofismo.

As halobactérias do bacalhau (arqueobactérias) fazem fotossíntese, ou respiração, associadas a heterotrofismo.

As leveduras (eucariontes) geralmente fermentam, e também são capazes de respirar, com heterotrofismo.

Tabela II. Combinações da energética e da biossíntese e os grupos de organismos onde essas combinações se encontraram.

	Autotrofismo	Heterotrofismo
Respiração	Químio-autotrofismo: várias eubactérias e várias arqueobactérias	Químio-heterotrofismo: animais, fungos, protozoários, muitas eubactérias e várias arqueobactérias
Fotossíntese	Foto-autotrofismo: plantas, algas e várias eubactérias	Foto-heterotrofismo: várias eubactérias e algumas arqueobactérias
Fermentação	desconhecido	Químio-heterotrofismo: animais, fungos, protozoários, muitas eubactérias e várias arqueobactérias

1.3.4. Genética, crescimento e multiplicação

As células, que constituem os organismos, multiplicam-se utilizando os nutrientes do meio e diz-se que a sua população cresce. A informação genética, que cada célula contém, multiplica-se com ela, e as células-filhas mantêm-se idênticas às suas progenitoras, excepto em caso de mutação, em que surgem células diferentes, que podem conduzir à evolução. Nos organismos com muitas células há diferenciação,

isto é, modificação das células em tecidos e órgãos, mas não há modificação genética das células que propagam o ser vivo.

2. Objectivos Gerais

Pretende divulgar-se um conjunto de protocolos que mostrem os micróbios, recorrendo a metodologias muito simples baseadas, sempre que possível, em substâncias de uso corrente culinário e farmacêutico: as leveduras do pão, do vinho e da cerveja, as bactérias do iogurte, as halobactérias do bacalhau, a acção de antibióticos e sua especificidade, e o efeito da temperatura, ilustrando os princípios básicos da esterilização e da conservação dos alimentos.

Embora o estudo das actividades microbianas propostas seja executado com organismos não-patogénicos, utilizar-se-ão todos os cuidados de assepsia, usados num laboratório normal de microbiologia, de modo a incutir nos jovens esses princípios.

Os protocolos experimentais foram já testados junto de alunos do ensino básico e do secundário. Pretende-se que os alunos ao realizarem experiências, descrevam os resultados obtidos e formulem hipóteses interpretativas. Desta maneira, serão levados a distinguir entre os processos científicos essencialmente sensoriais (observações, resultados) e os processos essencialmente mentais (conceitos, hipóteses, modelos, teorias).

3. Explicação das técnicas utilizadas

Os processos sensoriais são levados a cabo pelos nossos sentidos. Há aparelhos que auxiliam os sentidos, fazendo com que consigamos observar fenómenos por extensão dos nossos sentidos. Os microscópios permitem-nos observar objectos mais pequenos, ampliando-os, tornando-os acessíveis à nossa visão. Os aparelhos medidores do pH permitem-nos apreciar, com mais rigor do que o nosso sentido do paladar (e também com mais segurança), se um líquido é mais ou menos ácido, mais ou menos alcalino.

3.1. Microscópio

3.1.1. Utilização

É importante familiarizarmo-nos com os componentes do microscópio (**Fig. 2**) e com a sua manipulação, que deve ser efectuada com muito cuidado. Quando se termina a utilização, deve verificar-se que se deixa tudo em condições, de modo a melhorar a conservação do aparelho e a facilitar o seu uso posterior: desligar a iluminação, deixar a platina, as objectivas e as oculares devidamente limpas, proteger o microscópio do pó com pano ou capa, e guardá-lo em local apropriado.

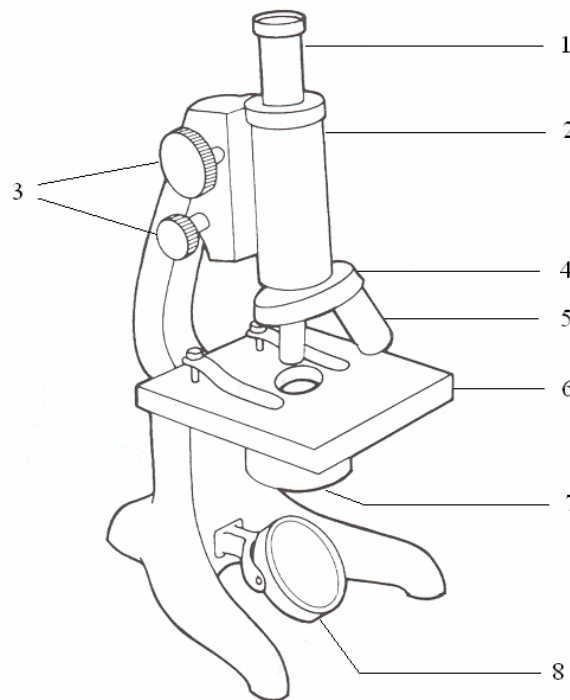


Figura 2. Esquema do microscópio.

Aquando de nova utilização, deve verificar-se se as lentes estão limpas, incluindo as objectivas (1), as oculares (5), e as do condensador (7). Para remover manchas de gordura ou de corantes, marcas de dedos, ou restos de óleo de imersão deixados na objectiva, deve usar-se papel suave seco ou muito levemente humedecido **com xilol**. **O xilol não** deve nunca aplicar-se directamente nas lentes, pois pode descolá-las.

A maioria dos microscópios pode montar-se com um canhão (2) binocular. Uma vez que a distância interpupilar é variável de pessoa para pessoa, deve o observador ajustar a distância entre as oculares, de maneira a fazer coincidir as duas imagens do campo óptico.

Nas operações de focagem, deve começar por utilizar-se a objectiva de menor ampliação (10x), rodando o revólver (4) até que esta objectiva encaixe na sua posição (fazendo um clique). Ajusta-se a preparação, previamente colocada na platina (6), no suporte móvel ou presa nas pinças, de modo a que a objectiva fique sobre a parte do material a observar. Seguidamente, liga-se a iluminação (ou desloca-se o espelho - 8) e ajusta-se a quantidade de luz que atravessa a preparação, fechando o diafragma. Com o auxílio do parafuso de focagem de maiores deslocamentos (parafuso macrométrico ou cremalheira: 3 em cima), desloca-se o canhão, acompanhando visualmente esse movimento, de maneira a que a objectiva se situe bem perto da preparação, mas sem lhe tocar. Ainda com a cremalheira, inicia-se então o afastamento lento da objectiva, observando pela ocular o surgimento da imagem no campo óptico. Se se tratar de microrganismos de pequenas dimensões e de reduzido contraste, pode ser de ajuda procurar focar uma das arestas da lamela, ou uma bolha de ar que tenha ficado aprisionada entre a lâmina e a lamela). Ajusta-se o foco com o parafuso de deslocamentos menores

(parafuso micrométrico: 3 em baixo). Desloca-se a preparação com auxílio dos parafusos da platina, ou com movimentos cuidadosos dos dedos, no caso de a lâmina estar fixada por pinças, mantendo sempre o indicador e o polegar duma das mãos sobre o parafuso micrométrico, de maneira a ir refocando os campos em observação.

Uma vez focada a imagem do objecto pretendido, com a objectiva de menor ampliação, pode passar-se para a objectiva de ampliação imediatamente superior (40x), sem mexer na focagem, e acompanhando visualmente de lado a rotação do revólver porta-objectivas, não esteja a objectiva mal colocada! Um leve ajustamento com o parafuso micrométrico, trará então a imagem ao seu foco. Deverá ser ainda necessário um ajuste na iluminação, abrindo o diafragma ou mesmo aumentando a intensidade luminosa.

Para utilizar a objectiva de imersão (100x), começa por rodar-se parcialmente o revólver, até a lente frontal estar perto da preparação. Coloca-se uma pequena gota de óleo de imersão sobre a superfície da lamela (ou sobre a superfície da própria preparação no caso de esfregaços secos), no ponto atravessado pelo feixe luminoso, e completa-se a rotação do revólver até se sentir a objectiva prender e mergulhar no óleo. Leve movimento do parafuso micrométrico levará à obtenção duma imagem nítida. Se tal não acontecer, deve procurar-se a causa, que pode estar numa deficiente iluminação (a iluminação tem de ser aumentada sempre que se passa para objectivas de maior ampliação), que pode ter motivado termos passado pelo foco sem nos termos apercebido. Mais uma vez, cuidado: não aproximar a objectiva da preparação, com os olhos na ocular! A aproximação da objectiva deve ser seguida por observação lateral directa; só o afastamento da objectiva da preparação, para focagem, deve ser seguido por observação pelo interior. O não-seguimento destas regras pode levar a danos nas preparações e, pior do que isso, nas lentes frontais das objectivas, que podem riscar-se, ficando com defeitos ópticos caros de reparar. Quanto à elaboração das preparações a observar, devem utilizar-se pequenas quantidades das culturas originais e de água, se for o caso. No caso de haver muito líquido, deve retirar-se o excesso com um pedaço de papel absorvente (o papel higiénico é suficientemente bom!). Deve também evitar-se a utilização de óleo de imersão em excesso e que ele se misture com a água da preparação.

3.1.2. Registo de observações microscópicas

O registo de observações, e sua interpretação, em microscopia óptica, obedece a vários requisitos que emanam da natureza da preparação e da informação pretendida. Seguem-se alguns exemplos, que pretendem ilustrar a aplicação concreta das normas:

- a. Descrever a observação, com auxílio dum desenho, e compará-la com a informação pretendida.
- b. O processo de registo deve realizar-se durante a observação e nunca de memória.
- c. Deve registar-se a morfologia celular desenhando as formas mais representativas, com dimensões tais que facilitem a sua percepção: a escala do registo é fornecida pela ampliação indicada e não pela dimensão do registo. Se as células ocorrerem em grupos, deve indicar-se o tipo de agregação.

- d. Para o registo e a identificação de estruturas intracelulares deve recorrer-se a uma legenda.
- e. Caso ocorra, deve indicar-se o tipo de movimento observado. Devem identificar-se as organelas que forem observáveis.
- f. A representação a cor só é relevante quando for observada.

3.2. Medição de pH

Através do paladar temos a sensação se um alimento é mais ou menos ácido. Os químicos estabeleceram uma escala que permite quantificar a acidez em termos de pH. O pH é 7 quando o líquido é neutro, como é o caso da água pura, e o seu valor é tanto mais baixo quanto mais ácido for o líquido. O sumo de limão e o vinagre têm o pH baixo. Se o líquido contiver menos protões do que a água diz-se que é básico e o seu pH é mais alto que 7. É, por exemplo, o caso da lixívia ou de uma solução de bicarbonato de sódio. O pH varia de 1 a 14. Líquidos com o pH muito alto (muito básicos) ou com o pH muito baixo (muito ácidos) são muito reactivos, tornando-se corrosivos. Muitos microrganismos só se multiplicam numa gama estreita de pH, sendo por isso muitas vezes necessário ajustar o pH dos meios de cultura.

Para medir o pH usam-se actualmente pequenos aparelhos digitais (**Fig. 3**), formados por um eléctrodo que se mergulha no líquido e um mostrador onde se lê directamente o pH.

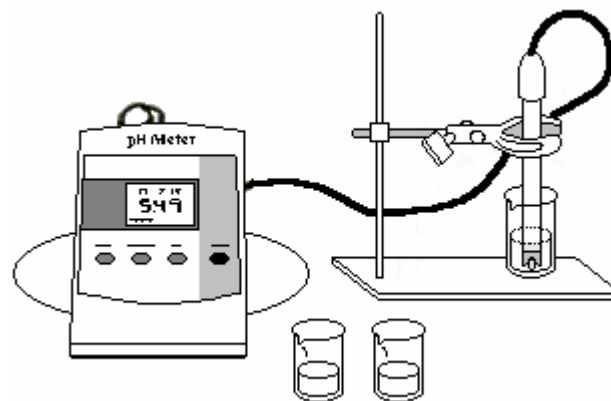


Figura 3. Esquema do medidor de pH.

Para o seu bom funcionamento, o eléctrodo deve ser passado por água limpa e limpo com papel absorvente antes de ser mergulhado na amostra cujo pH se pretende medir. Após a imersão, a leitura do pH no mostrador pode demorar algum tempo a estabilizar (no máximo 2 ou 3 min).

Para se obter um valor fiável, é necessário calibrar o aparelho com alguma frequência. Para tal são necessárias duas soluções padrão com pH 7 e pH 4. O aparelho dispõe de dois pequenos parafusos que permitem o ajuste a esses valores de pH com uma pequena chave de fendas.

Quando se guarda o aparelho, deve desligar-se e colocar-se a tampa de protecção do eléctrodo.

3.3. Esterilização no autoclave ou na panela de pressão

O autoclave ou a panela de pressão (**Fig. 4**) utilizam-se na esterilização de meios de cultura, contidos em frascos ou em balões de Erlenmeyer. Os frascos devem conter meio somente até ao máximo de dois terços da sua capacidade. Devem ser rolhados com algodão cardado que pode proteger-se com papel de estanho ou de embrulho atado com cordel. No caso de terem rolha de enroscar, a rolha não deve ficar muito apertada, de modo a deixar sair o vapor de água que se libertar durante a esterilização.

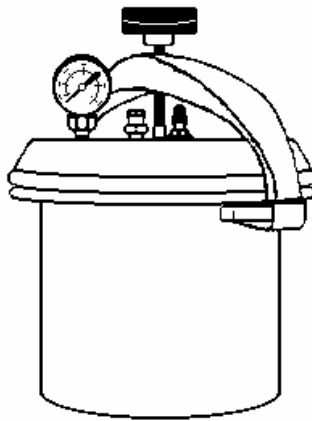


Figura 4. Pequeno autoclave (panela de pressão com manómetro).

A esterilização só é eficiente se for realizada sob pressão de vapor a 1 atmosfera (correspondente a 120°C) acima da pressão ambiental, durante entre 20 minutos (para recipientes de pequenas dimensões, até 1 litro) a 30 minutos. Pressões mais elevadas, ou maior duração da esterilização, são eficientes mas podem danificar componentes dos meios de cultura.

Antes de fechar o autoclave para que a pressão suba, deve deixar-se sair o ar com saída contínua e forte de vapor e, depois de a pressão atingir 1 atmosfera, deve iniciar-se a contagem do tempo e vigiar-se (ligando ou desligando as resistências eléctricas) para que a pressão se mantenha durante o tempo de esterilização. No caso da panela de pressão, começa a contar-se o tempo quando se liberta o ar com vapor forte. Terminado o tempo, desliga-se e deixa-se arrefecer antes de abrir. Agitam-se cuidadosamente os meios que tiverem tendência para formar depósitos (todos os meios que contêm agar), e podem utilizar-se imediatamente para fazer placas em caixas de Petri.

Os meios só devem ser inoculados com microrganismos, depois de arrefecerem à temperatura conveniente, que pode diferir de organismo para organismo. A temperatura ambiente é geralmente apropriada para a maioria dos microrganismos

serem inoculados, o que não significa que seja essa a sua temperatura óptima de crescimento.

3.4. Técnicas de assepsia

A manipulação de microrganismos e de meios de cultura deve realizar-se assepticamente, em câmaras esterilizadas apropriadas (**Fig. 5**) ou, alternativamente e mais vulgarmente, junto a um bico de gás (**Fig. 6**). Manipulações rápidas e de menor importância, ou que digam respeito a culturas que não necessitem de grandes períodos de incubação, podem efectuar-se junto a uma lamparina de álcool.

A chama esteriliza pelo seu calor e cria uma corrente de ar quente que afasta o ar contaminado. Correntes de ar exterior durante a manipulação podem prejudicar a eficiência da operação.

Devem passar-se rápida, mas determinadamente, pela chama os bucais dos frascos ou dos balões (**Fig. 7**), assim como as pipetas. As ansas de repicagem devem ir ao rubro, necessitando por isso de arrefecimento posterior nas placas, nos balões, ou no próprio meio de cultura, antes de serem usadas no transporte dos microrganismos.

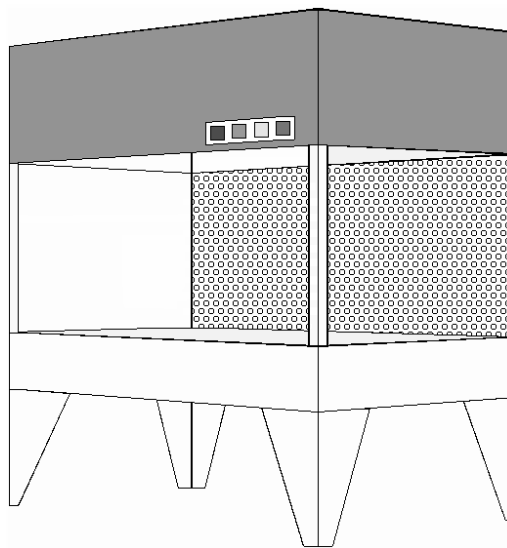


Figura 5. Esquema de câmara de fluxo laminar para manipulação em assepsia.



Figura 6. Esquemas de bico de gás e de lamparina para manipulação em assepsia.

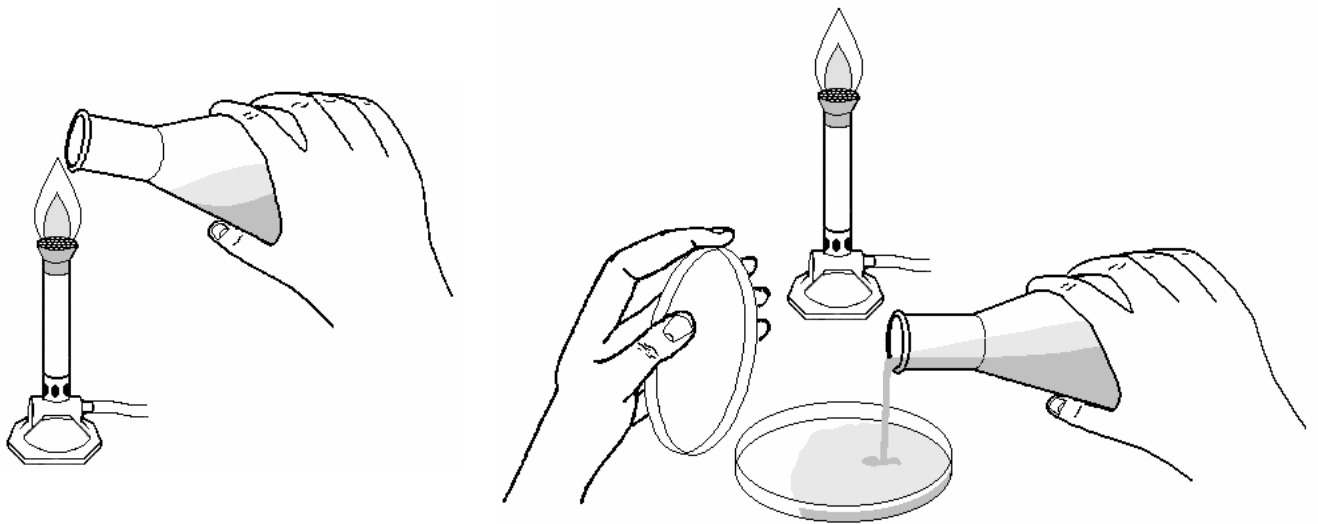


Figura 7. Preparação de placas através da manipulação asséptica de caixas de Petri e de meio de cultura contido num balão de Erlenmeyer.

3.5. Isolamento de micróbios

A partir duma amostra, retirada da natureza, é geralmente possível isolar alguns dos microrganismos que lá se encontram, desde que se tenha meio de cultura apropriado para o seu crescimento. Embora o crescimento seja mais rápido e homogéneo em meios de cultura líquidos, para a separação dos micróbios uns dos outros, isto é, para o seu isolamento em cultura pura, têm necessariamente de se utilizar meios sólidos. Após isolamento, das colónias em placas de meio sólido, a cultura, obtida a partir duma colónia, deve manter-se no mesmo meio.

3.5.1. Placa de isolamento

Com uma ansa de repicagem, inocula-se a cultura, ou a suspensão contendo microrganismos, à superfície do meio sólido contido numa placa. O traço inicial, feito a um canto da placa, é espalhado imediatamente por passeios apertados, de maneira a ir diluindo a amostra e a separar as células. Assim, cada colónia que crescer isoladamente das outras deve ser proveniente duma única célula. Alternativamente, é geralmente mais eficiente ir diluindo a cultura que ficou no traço inicial, após esterilizações sucessivas da ansa (**Fig. 8**). Seja como for, esteriliza-se sempre a ansa ao rubro e, antes de cada utilização, arrefece-se numa zona da placa que não contenha células (centro da placa).

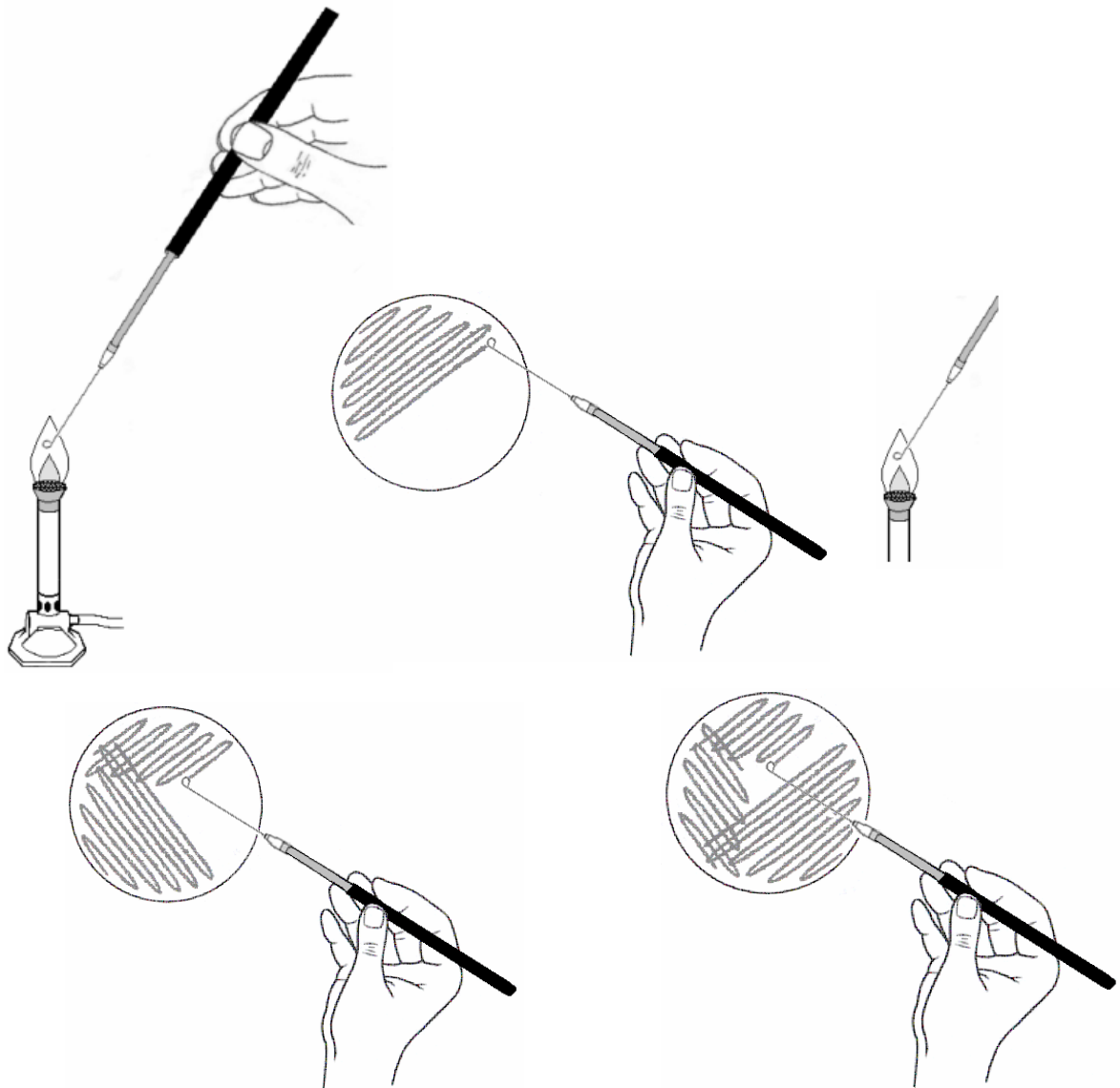


Figura 8. Operações da técnica de placa de isolamento.

3.5.2. Placa de individualização

O objectivo desta técnica é a obtenção de colónias bem separadas de modo a poderem contar-se (**Fig. 9**).

Com auxílio duma pipeta esterilizada, inocula-se, no centro duma placa com meio sólido, 0,1ml duma suspensão de células convenientemente diluída. Espalha-se por toda a placa, com uma vareta de vidro, dobrada em L, e imediatamente antes esterilizada com chama de álcool (molhada em álcool e passada pela chama, somente para que o álcool arda). Antes da utilização, arrefece-se a vareta na parte interior da tampa da caixa de Petri.

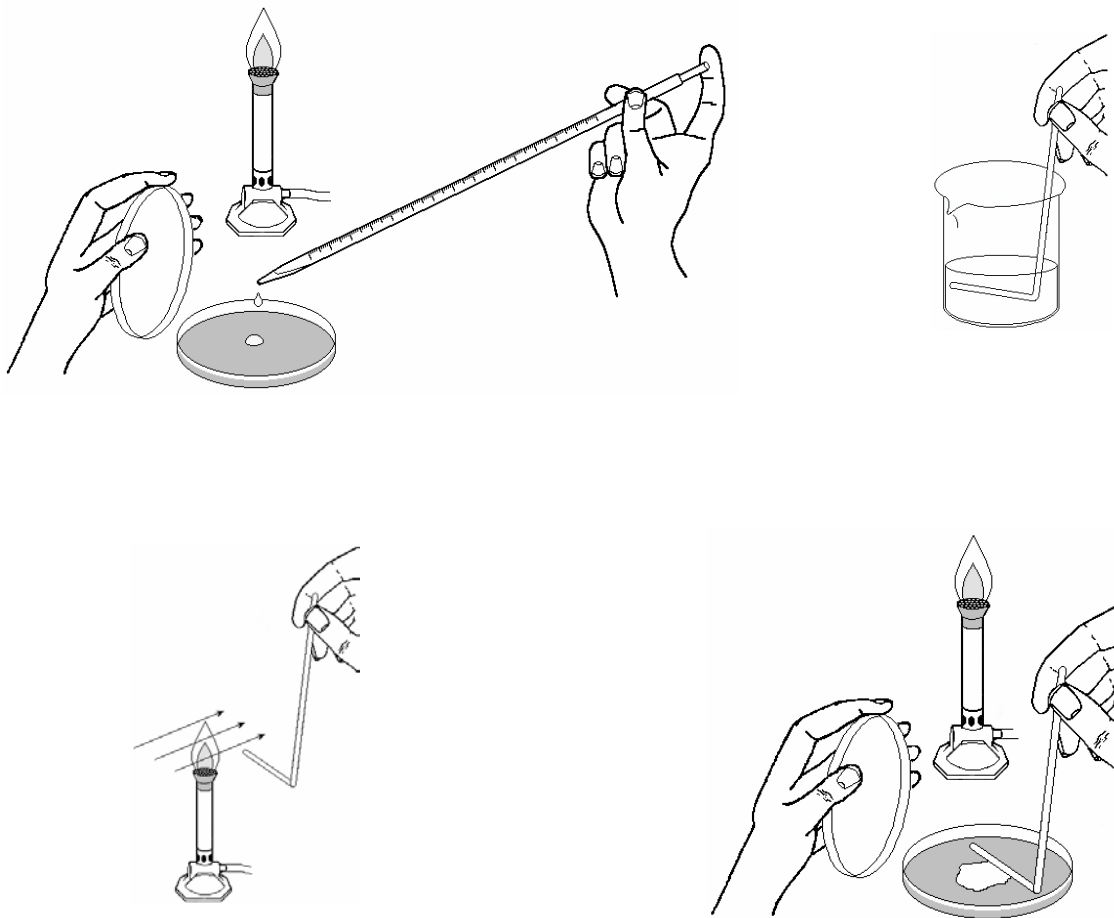


Figura 9. Técnica da placa de individualização

Para adequada previsão dos resultados, e cálculo da fracção das células viáveis da população inoculada, deve fazer-se uma contagem microscópica prévia, em câmara de contagem (**Fig. 10**), das células da suspensão. É geralmente necessário fazer uma diluição da suspensão, antes da sua inoculação no meio sólido.

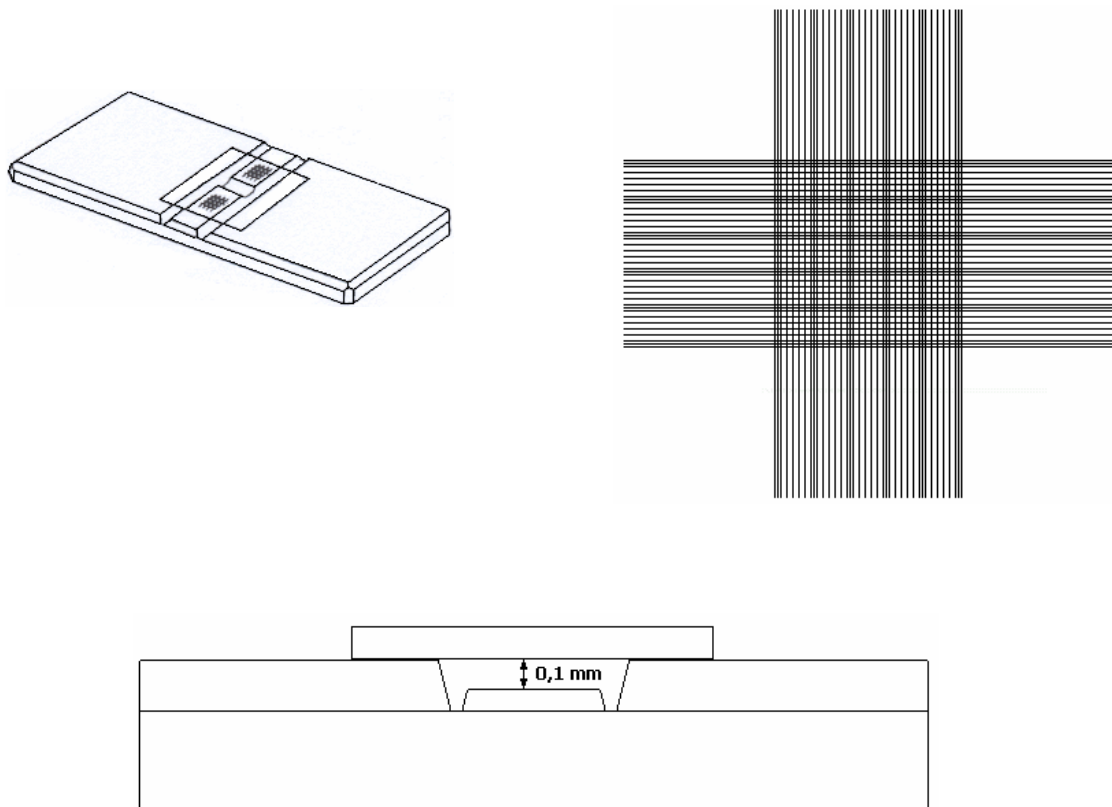


Figura 10. Câmara de contagem de células ao microscópio.

3.5.2.1. Utilização da câmara de contagem (seguir com o auxílio da **Fig. 9**).

A câmara de contagem, também conhecida pelo nome de hemocitómetro, é constituída por uma lâmina, mais grossa do que as lâminas normais utilizadas em observações microscópicas. Tem uma parte central a um nível 0,1mm inferior do que o resto da lâmina, de modo a deixar um intervalinho de 0,1mm de altura quando, nas partes laterais, assenta uma lamela (mais espessa do que as lamelas vulgares). Na parte central, há duas grelhas em cruz, sendo o centro de cada cruz um quadrado grande de 1 mm de lado, dividido em 25 quadrados médios, cada um dos quais, por sua vez, dividido em 25 quadrados pequenos. O quadrado grande constitui a base de observação para a contagem de organismos contidos num prisma quadrangular com 1mm^2 de base e 0,1mm de altura, ou seja, com $0,1\text{mm}^3$ de volume. A lamela deve, previamente, aderir aos seus assentos, fazendo passar nestes um dedo levemente humedecido em água, e pressionando a lamela com movimentos curtos e firmes, na direcção perpendicular à maior dimensão da lâmina. Uma vez a lamela aderente, do modo a não cair se a lâmina for invertida, coloca-se uma gota duma suspensão de organismos (bem agitada, para que a amostra seja significativa da população) na margem da lamela onde ela se separa (os tais 0,1mm)

da lâmina: por capilaridade, a gota vai penetrar no espaço prismático. Coloca-se a câmara de contagem no microscópio e realiza-se a contagem. Após utilização, deve lavar-se a câmara e a lamela com água corrente, secá-las com papel higiênico e guardá-las na caixa.

3.5.3. Placa de incorporação

É particularmente útil para organismos que não tolerem muito o oxigênio, e que resistam a temperaturas até 45°C, como as bactérias do iogurte. Inocula-se 1ml duma suspensão de células, em cerca de 20ml de meio sólido, previamente preparado e esterilizado, conservado fundido num tubo a 45°C. Agita-se e deita-se para uma caixa de Petri esterilizada, que se fecha logo com a tampa, e à qual se imprimem leves e curtos movimentos rotativos. Deixa-se repousar e solidificar, incuba-se e aguarda-se até se obter crescimento das colónias, que devem ficar isoladas, distribuídas por todo o meio sólido.

A partir do tubo inicial, com o meio ainda liquefeito, podem fazer-se, rapidamente para evitar que o meio solidifique no tubo, diluições para meio idêntico contido em novos tubos (1ml/20ml), que se despejam para outras tantas caixas de Petri. As placas, que assim se obtêm, contêm, eventualmente, uma diluição apropriada à contagem e isolamento do organismo em que estamos interessados.

Para mais adequada previsão dos resultados, deve fazer-se uma contagem microscópica prévia, em câmara de contagem, das células da suspensão, de forma a obter cerca de 300 células no primeiro tubo.

3.6. Cuidados de manipulação e tratamento do material de vidro

Devem seguir-se, rigorosamente, todos os passos dos protocolos. Embora os organismos utilizados não sejam patogénicos, podem crescer nos meios de cultura populações doutros organismos desconhecidos se as manipulações não forem cuidadosas, ou apesar de serem cuidadosas. No ambiente que nos rodeia, existem esporos e células vegetativas de bactérias ou de fungos, em maior ou menor quantidade, que podem tornar-se prejudiciais se propiciarmos a sua multiplicação.

As caixas de Petri devem selar-se em toda a volta, com fita gomada, e esterilizarem-se numa panela de pressão (ou autoclave) durante 30 minutos, antes de serem abertas para se lavarem. Alternativamente, deixam-se mergulhadas em lixívia diluída, dum dia para o outro, antes de se deitarem fora em sacos de plástico fechados (se as caixas de Petri forem de plástico), ou antes de serem lavadas (se forem de vidro). Idênticos cuidados devem seguir-se para balões de Erlenmeyer e para tubos de ensaio.

4. Trabalhos experimentais

4.1. Um eucarionte: a levedura de padeiro

As leveduras são organismos do domínio dos eucariontes, reino dos fungos. São estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que medeiam a produção de pão, de vinho e de cerveja. Esta espécie geralmente obtém energia por fermentação alcoólica, produzindo etanol, embora também tenha capacidade para respirar aerobiamente. Pode cultivar-se em meios líquidos, como sumo de uva, ou em placas de meios sólidos, como os que a seguir se descrevem. As leveduras que contituem o fermento de padeiro são diplóides. É possível obter culturas haplóides (a e α) a partir de ascósporos induzidos em meio de esporulação (ver adiante). O ciclo meiótico e os ciclos mitóticos de *Saccharomyces cerevisiae* estão esquematizados na **Fig. 11**.

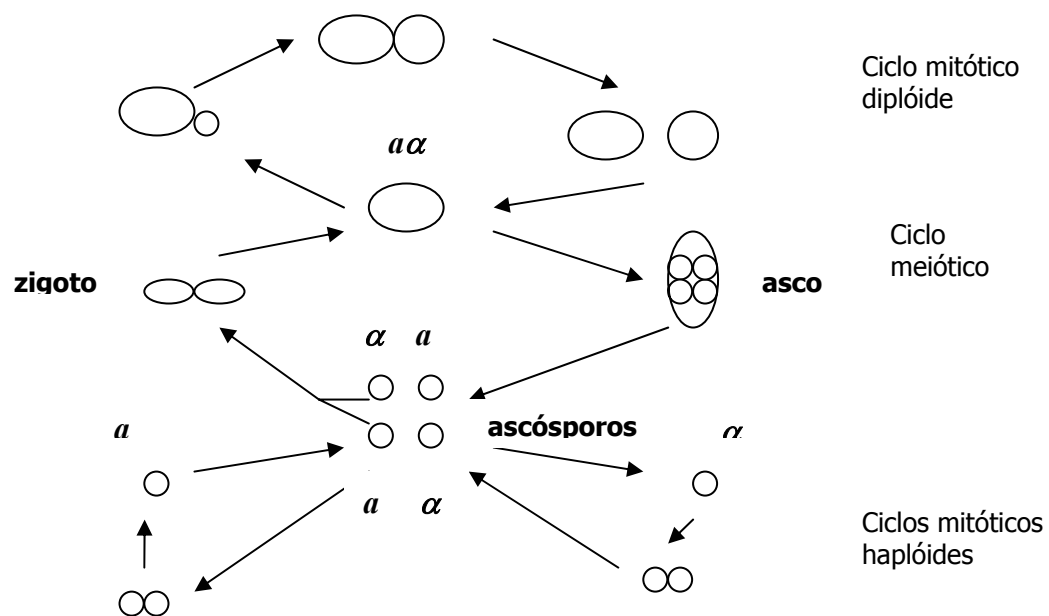


Figura 11. Ciclo meiótico e ciclos mitóticos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.1. Observação microscópica de células de levedura

Material

Porção de fermento de padeiro fresco
Água
Lâminas
Lamelas
Microscópio

Execução

Suspender cerca de 0,25g de fermento de padeiro em 10ml de água.
Retirar uma gota da suspensão de células e colocar sobre uma lâmina;
cobrir com a lamela (**Fig. 12**).
Observar ao microscópio, começando pela objectiva de menor ampliação.

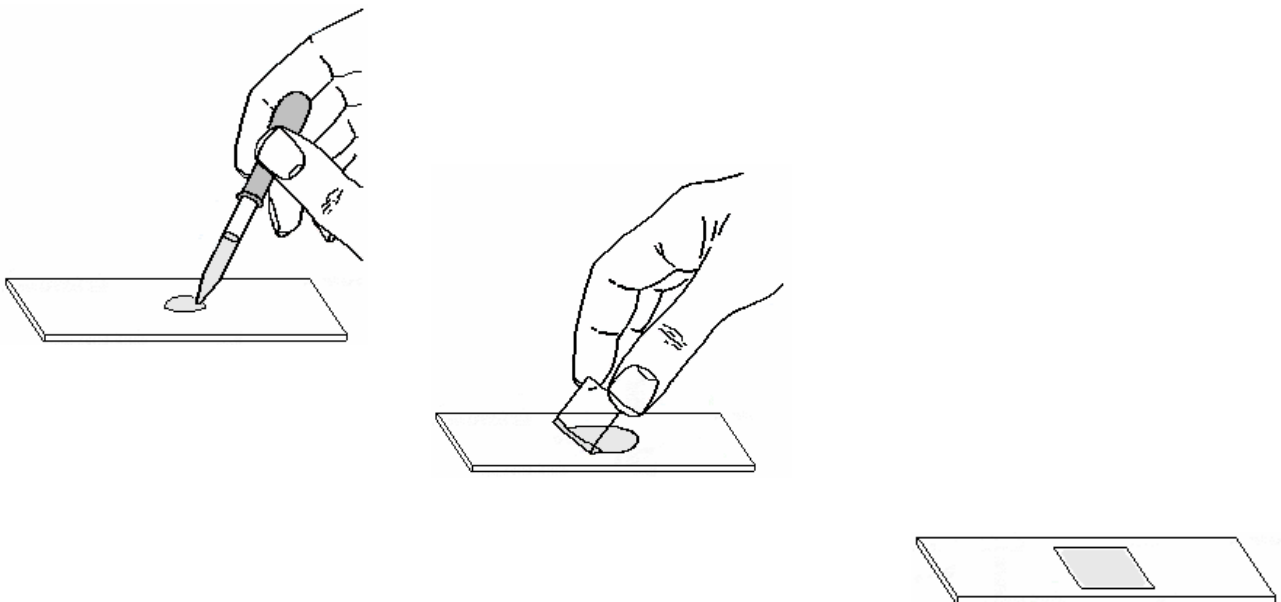


Figura 12. Elaboração duma preparação microscópica.

4.1.2. Preparação de meio para leveduras em placas de meio sólido

Material

Balões de Erlenmeyer de 0,5 litro
Mel
Agar
Autoclave ou panela de pressão
Caixas de Petri esterilizadas

Execução

Deitar 100ml de água para um balão.
Adicionar 2 a 4g de mel.
Adicionar 2g de agar.
Autoclavar durante 20 minutos a 1 atmosfera ou ferver durante o mesmo tempo na panela de pressão.
Deitar para caixas de Petri esterilizadas junto à chama (**Fig. 6**), e deixar arrefecer.

4.1.3. Isolamento de leveduras

Material

Porção de fermento fresco
Água esterilizada
Placas com meio sólido
Ansa
Tubo de ensaio estéril
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)

Suspender um pedaço muito pequeno de fermento em 5ml de água esterilizada contida num tubo de ensaio.
Esterilizar a ansa à chama.
Arrefecer no interior do tubo sem tocar na suspensão.
Mergulhar a ansa na suspensão e fazer uma placa de isolamento no meio sólido contido na placa.
Se possível, fazer placas de incorporação e também de individualização, após contagem na câmara e diluições apropriadas.
Colocar as placas a 25°C ou à temperatura ambiente.
Após alguns dias observar as colónias.

4.1.4. Observação microscópica a partir de colónias isoladas (Fig. 13) e contagem de colónias nas placas de individualização.

Execução

Retirar, junto à chama, com uma ansa de repicagem, uma porção pequenina de células duma colónia isolada duma placa de isolamento ou de individualização.

Depositar essas células numa gota de água, colocada sobre uma lâmina.

Cobrir com uma lamela.

Observar ao microscópio óptico.

Contar, a olho nu, as colónias nas placas de individualização, e calcular o número de células na população da suspensão utilizada.

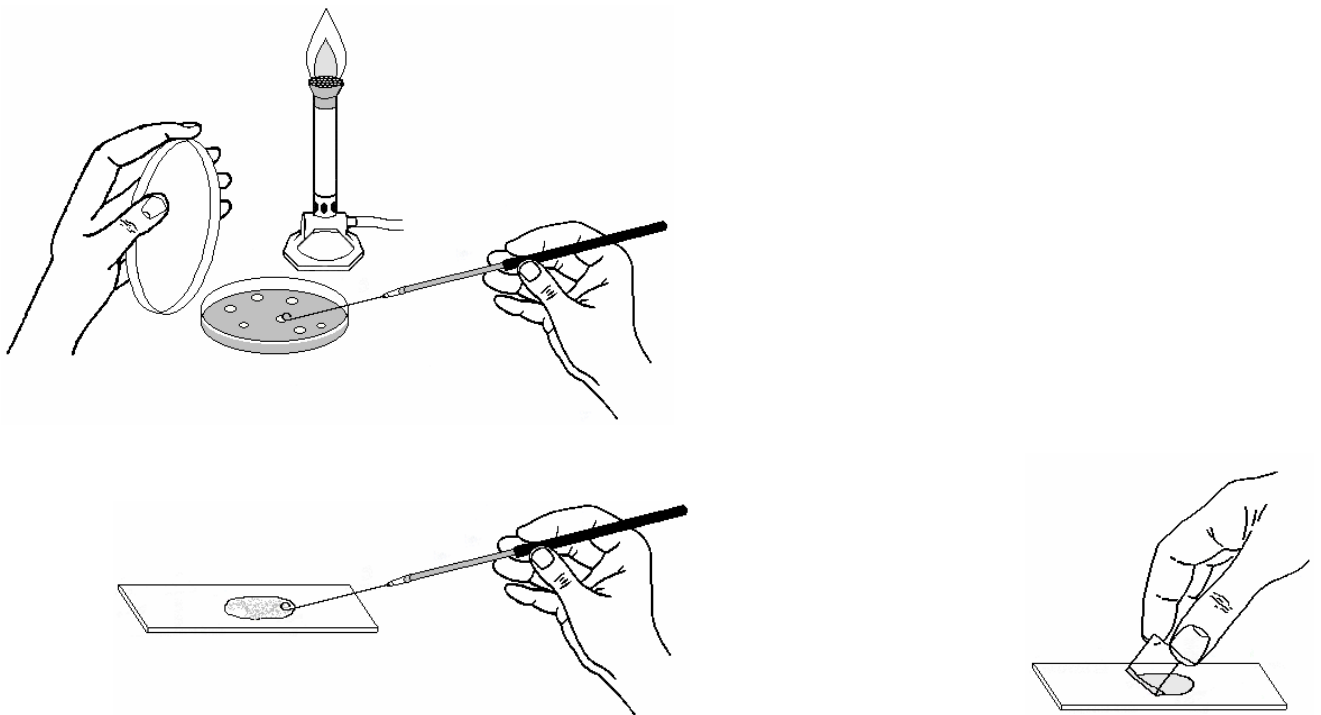


Figura 13. Suspensão de células em lâmina para observação microscópica, a partir de colónias isoladas.

4.1.5. Observação de ascósporos de *Saccharomyces cerevisiae* em fermento comercial de padeiro (Protocolo desenvolvido por J. Baptista Ascensão, 1994, Universidade do Minho):

Material

Fermento fresco
Agar
Ácido acético laboratorial ou vinagre de cozinha
Hidróxido de potássio (ou potassa cáustica - KOH)
Saquetas de açúcar (sacarose) para adoçar café
Extracto de levedura
Água destilada
Medidor de pH
Caixas de Petri, de preferência esterilizadas
Copo de vidro com vareta de vidro dobrada em L
Álcool
Espátula ou ansa de repicagem
Balança
Copos de vidro de 100 e 250ml
Pipetas de 0,5ml
Chama
Placa de aquecimento

Preparação do meio de esporulação

Colocar 100ml de água destilada num copo de vidro.
Adicionar cerca de 2,5g de KOH, sólido, se a pureza for de cerca de 85%.
Adicionar vinagre de cozinha ou ácido acético laboratorial, até o pH se situar entre 6 e 7.
Adicionar 0,05g de sacarose (na falta de balança com sensibilidade adequada, introduzir a polpa do dedo indicador na sacarose; sacudir com o polegar a sacarose aderente para o meio em preparação. Nota: os dedos devem estar secos).
Adicionar 0,2g de extracto de levedura.
Adicionar 4g de agar e um volume de água necessário para perfazer 200ml.
Aquecer até à fervura, que pode prolongar-se por 10-15 minutos.
Deitar o meio preparado para caixas de Petri, operando junto à chama (**Fig. 7**).
Deixar arrefecer até solidificar.

Inoculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de esporulação

(Junto à chama)

Preparar uma suspensão espessa de fermento fresco: suspender 1g de fermento fresco em 1ml de água.

Deitar, com uma pipeta, 0,2ml da suspensão de células para o meio contido numa placa.

Espalhar com a vareta de vidro dobrada em L.

Deixar à temperatura ambiente.

Após pelo menos 1 dia, retirar, junto à chama, uma porção de células, com uma espátula ou uma ansa de repicagem.

Suspender essas células numa gota de água, colocada sobre uma lâmina.

Cobrir com lamela.

Observar ao microscópio óptico.

4.1.6. Crescimento de leveduras em sumo de uva

Material

Sumo de uva
Porção de fermento fresco
Iogurteira
Medidor de pH

Execução

Encher 6 boiões da iogurteira com 100ml de sumo de uva.

Numerá-los de 1 a 6.

Inocular os boiões 1, 3 e 5 com um pedaço muito pequeno de fermento (Sugestão: utilizar um palito para retirar pedaços pequenos).

Colocar os boiões 1 e 2 na iogurteira, os 3 e 4 à temperatura ambiente, e os 5 e 6 no frigorífico.

Construir um quadro avaliando durante 5 dias os seguintes parâmetros:

- a. pH
- b. Cheiro
- c. Turvação
- d. Libertação de gás (CO₂)

Interpretar os resultados.

4.2. Eubactérias: as bactérias do iogurte

As bactérias do iogurte medeiam a transformação do leite em iogurte. Utilizam a lactose como fonte de carbono e de energia, levando a cabo uma fermentação láctica, como principal processo gerador de energia. São eubactérias Gram positivas de baixo conteúdo G+C. Os iogurtes devem conter quantidades aproximadamente iguais de *Streptococcus* e de *Lactobacillus*.

4.2.1. Observação microscópica das bactérias do iogurte

Material

Iogurte magro natural
Ansa
Lâminas
Lamelas
Microscópio

Execução

Mergulhar a ansa no iogurte.
Fazer um esfregaço fino numa lâmina limpa.
Observar ao microscópio, começando pela objectiva de menor ampliação.
Tentar distinguir os dois tipos de bactérias lácticas.

Notas

Pode fazer-se o mesmo com o soro do iogurte, que embora possua muito menos bactérias, não tem tanta gordura.

Pode corar-se com uma gota de mercurocromo, que se espalha na altura de fazer o esfregaço.

4.2.2. Preparação de meio de cultura em placas para bactérias do iogurte

Material

Balões de Erlenmeyer de 0,5 l
Extracto de levedura
Lactose
Peptona
Agar
Panela de pressão ou autoclave
Caixas de Petri, previamente esterilizadas
Chama

Execução

Verter 100ml de água para um balão.
Adicionar 0,5g de extracto de levedura.
Adicionar 0,5g de peptona.
Adicionar 0,5g de lactose.
Adicionar 1,5g de agar.
Autoclavar durante 20 minutos a 120°C (1 atmosfera) ou ferver o mesmo tempo em panela de pressão.
Verter para caixas de Petri, junto à chama (**Fig. 7**), e deixar arrefecer.
As placas ficam feitas e prontas a usar quando o meio tiver solidificado.
Se possível, fazer também placas de incorporação, como indicado atrás.

4.2.3. Isolamento de bactérias do iogurte

Material

Iogurte magro natural
Ansa
Placas com meio sólido
Parafilme ou película aderente
Chama
Estufa a 37°C, ou iogurteira

Execução

(Trabalhar junto à chama)

Abrir o iogurte perto da chama.

Esterilizar a ansa à chama (deixar ir ao rubro).

Deixar arrefecer e mergulhar no soro do iogurte.

Fazer um riscado numa placa contendo meio sólido.

Selar a placa com tiras de parafilme ou película aderente.

Colocar na estufa a 37°C.

Alguns dias depois tentar observar os 2 tipos de colónias:

- a. Colónias muito transparentes em forma de flor (*Lactobacillus*)
- b. Colónias brancas, pequenas e redondas (*Streptococcus*)

Sugestões

Retirar, junto à chama, uma porção de células dum tipo de colónia isolada, com uma ansa. Depositar essas células numa gota de água, colocada sobre uma lâmina. Cobrir com lamela. Observar ao microscópio, tentando identificar os microrganismos.

Retirar, com uma ansa junto à chama, uma porção de células dum tipo de colónia isolada. Fazer uma placa de isolamento. Colocar na estufa a 37°C. Fazer para os dois tipos de colónias, com vista a obter-se um crescimento isolado dos dois géneros de microrganismos.

4.3. Arquebactérias: as halobactérias do bacalhau

As halobactérias são contaminantes habituais do bacalhau seco salgado. Crescem à sua superfície, como manchas avermelhadas, e exalam um cheiro característico a bacalhau podre, mesmo quando o bacalhau está em perfeitas condições de utilização. Para o isolamento destes organismos, põe-se num meio líquido (como o descrito abaixo, omitindo o agar) uma pequena lasca de bacalhau (preferencialmente, se já estiver com cheiro intenso e manchas) e incuba-se a uma temperatura de 37-50°C, durante 1-4 semanas. Uma iogurteira proporciona a temperatura ideal, e um boião de vidro é um óptimo recipiente. Quando o meio de cultura ficar com cor vermelha e o cheiro conhecido a bacalhau estragado, pode proceder-se ao isolamento das bactérias em placas. As halobactérias do género *Halobacterium* são cilíndricas e têm movimento por flagelos; as do género *Halococcus* são esféricas.

4.3.1. Observação microscópica directa a partir do bacalhau proteolizado

Material

Bacalhau que apresente zonas vermelhas e cheiro intenso.

Tubo de ensaio

Água destilada

Sal

Ansa de repicagem

Lâmina

Lamela

Microscópio

Execução

Retirar ou raspar um pedaço pequeno de bacalhau duma zona que esteja vermelha.

Colocar num tubo de ensaio contendo 1 a 2ml de solução salina de NaCl (20%)

Agitar bem.

Mergulhar a ansa na solução.

Colocar uma gota numa lâmina limpa.

Colocar lamela.

Observar ao microscópio, começando pela objectiva de menor ampliação.

4.3.2. Meio de cultura em placas para halobactérias

Material

Bacalhau
Panela
Copos de precipitação
Proveta
Funil
Papel de filtro
Sal
Medidor de pH
NaOH (soda cáustica)
Agar
Caixas de Petri
Placa de aquecimento

Execução

Cozer 200g de bacalhau em 0,5l de água durante 30 min.
Filtrar a água de cozedura através de papel de filtro.
Verter o líquido para um copo de precipitação.
Deixar arrefecer.
Por cada 100ml juntar 20g de sal.
Retirar o sal em excesso que não se dissolveu.
Acertar a pH 7 com NaOH com ajuda do medidor de pH.
Adicionar 2g de agar por cada 100ml.
Aquecer a solução até entrar em ebulição.
Retirar a espuma em excesso, verter para caixas de Petri (**Fig. 7**), e deixar arrefecer.

4.3.3. Isolamento de halobactérias

Material

Bacalhau que apresente zonas vermelhas e cheiro intenso
Ansa de repicagem
Placas com meio de cultura sólido
Parafilme ou película aderente
Chama
Estufa a 40°C ou iogurteira

Execução

Esfregar um pedaço de bacalhau numa zona que esteja vermelha numa placa com meio de cultura sólido.
Selar a placa com tiras de parafilme ou película aderente.
Colocar na estufa a 40°C, ou na iogurteira.
Passados alguns dias, identificar as colónias vermelhas, e fazer placas de isolamento a partir de colónias isoladas. (Podem também fazer-se placas de individualização.)
Colocar na estufa a 40°C, ou na iogurteira.
Passados alguns dias voltar a observar.

Sugestões

Retirar uma porção de células duma colónia isolada, com uma ansa de repicagem. Depositar essas células numa gota de meio líquido, colocada sobre uma lâmina. Cobrir com lamela. Observar ao microscópio tentando distinguir os microrganismos. Para o isolamento destes organismos, pôr uma pequena lasca de bacalhau (preferencialmente, se já estiver com cheiro intenso e manchas) em meio líquido (como o descrito acima, omitindo o agar) e incubar a uma temperatura de 37-50°C, durante 1-4 semanas. Uma iogurteira proporciona a temperatura ideal, e um boião de vidro é um ótimo recipiente. Quando o meio de cultura ficar com cor vermelha e o cheiro conhecido, pode retirar-se uma porção de meio de cultura, com uma ansa. Depositar a gota de meio líquido sobre uma lâmina. Cobrir com lamela. Observar ao microscópio tentando distinguir os microrganismos.

4.4. Resistência de bactérias a antibióticos

As bactérias são sensíveis a substâncias químicas, sintetizadas por outras bactérias ou por fungos, que as inibem de se multiplicar, ou produzem mesmo a morte. São os antibióticos de grande importância no tratamento de infecções, sendo muitas vezes conveniente, antes da aplicação do antibiótico, efectuar um antibiograma, isto, é um teste de sensibilidade da bactéria que produz a infecção a um conjunto de antibióticos.

4.4.1. Meio para antibiogramas

Material

Carne de frango
Panela
Balões de Erlenmeyer de 0,5l
Proveta de 250ml
Funil
Papel de filtro
Medidor de pH
NaOH (soda cáustica)
Mel
Agar
Panela de pressão ou autoclave
Caixas de Petri
Placa de aquecimento

Execução

Cozer 200g de frango em 0,5 l de água.
Verter o líquido para um balão de Erlenmeyer.
Deixar arrefecer ou arrefecer no frigorífico.
Filtrar a água de cozedura, através de papel de filtro, para uma proveta.
Por cada 100ml juntar 2g de mel.
Acertar a pH 7 com NaOH.
Adicionar 4g de agar por cada 100ml.
Autoclavar durante 20 min a 120°C e 1 atmosfera, ou ferver durante o mesmo tempo numa panela de pressão.
Verter para caixas de Petri junto à chama, e deixar arrefecer.

4.4.2. Preparação de soluções de antibióticos

4.4.2.1. Ampicilina

Material

Medicamento: AMPLIFAR– para 250ml de
Suspensão oral (50mg de Ampicilina/ml), Tecnifar
Água esterilizada
Pipetas
Tubos de ensaio
Balança de precisão
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)
Pesar 2g do medicamento em pó.
Numerar 4 tubos de ensaio de 1 a 4.
Colocar 10ml de água esterilizada no tubo 1 e 9 ml nos restantes.
Colocar os 2g de medicamento no tubo 1 e agitar bem.
Utilizar pipetas diferentes nos passos seguintes:
Pipetar 1ml do tubo 1 para o tubo 2 e agitar bem.
Pipetar 1ml do tubo 2 para o tubo 3 e agitar bem.
Pipetar 1ml do tubo 3 para o tubo 4 e agitar bem.
No tubo 4 estará uma solução final com 28 μ g/ml de ampicilina.

4.4.2.2. Bacitracina

Material

Medicamento: BACITRACINA zimaia – pomada
(500U de Bacit./g), 10g, Laboratório ZIMAIA
Água esterilizada
Copo de precipitação pequeno
Pipeta
Vareta
Tubo de ensaio
Balança de precisão
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)
Pesar 1g do medicamento para o copo de precipitação.
Juntar 10ml de água esterilizada e mexer bem com a vareta.
Passar os 10ml para um tubo de ensaio.
No tubo estará uma solução final com 50 U/ml de bacitracina.

4.4.2.3. Cloramfenicol

Material

Medicamento: CLOROCIL – colírio
(8mg de cloramfenicol/ml), 5ml, EDOL
Água esterilizada
Pipetas
Tubos de ensaio
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)
Encher 2 tubos com 9ml de água esterilizada.
Utilizar pipetas diferentes nos passos seguintes:
Pipetar 1ml do medicamento para um tubo (tubo 1) e agitar bem.
Pipetar 1ml do tubo 1 para o tubo 2 e agitar bem.
No tubo 2 estará uma solução final com 80µg/ml de cloramfenicol.

4.4.2.4. Penicilina

Material

Medicamento: Prevecilina forte – suspensão injectável
(1.000.000 UI de penicilina/3ml), Grunenthal
Água esterilizada
Pipetas
Tubos de ensaio
Balança de precisão
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)
Pesar 0,5g do medicamento em pó.
Numerar 4 tubos de ensaio de 1 a 4.
Colocar 10ml de água esterilizada no tubo 1 e 9 ml nos restantes.
Colocar os 0,5g de medicamento no tubo 1 e agitar bem.
Utilizar pipetas diferentes nos passos seguintes:
Pipetar 1ml do tubo 1 para o tubo 2 e agitar bem.
Pipetar 1ml do tubo 2 para o tubo 3 e agitar bem.
Pipetar 1ml do tubo 3 para o tubo 4 e agitar bem.
No tubo 4 estará uma solução final com 50 UI/ml de penicilina

4.4.2.5. Tetraciclina

Material

Medicamento: Cloridrato de TETRACICLINA – cápsulas (500mg de tetraciclina/cápsula) Laboratório da F. M. do Nascimento

Água esterilizada

Pipetas

Tubos de ensaio

Balança de precisão

Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)

Numerar 3 tubos de ensaio de 1 a 3.

Colocar 10ml de água esterilizada no tubo 1 e 9 ml nos restantes.

Colocar uma cápsula do medicamento no tubo 1, esperar que esta se desfaça e agitar bem.

Utilizar pipetas diferentes nos passos seguintes:

Pipetar 1ml do tubo 1 para o tubo 2 e agitar bem.

Pipetar 1ml do tubo 2 para o tubo 3 e agitar bem.

No tubo 3 estará uma solução final com 500 μ g/ml de tetraciclina.

4.4.3. Preparação do antibiograma

4.4.3.1. Inoculação de células de *Bacillus cereus* IP 5832 em meio para antibiogramas

Material

Medicamento: Bactisubtil (*Bacillus cereus* IP 5832) –
cápsulas, Hoechst Marion Roussel
Água esterilizada
Pipetas
Tubo de ensaio
Placa com meio sólido
Copo de vidro com vareta de vidro em L, mergulhada
em álcool
Chama

Execução

(Trabalhar junto à chama)

Colocar uma cápsula do medicamento no tubo de ensaio com 5ml de água esterilizada, esperar que esta se desfaça e agitar bem.

Pipetar 0,1ml da suspensão para o meio contido na placa.

Espalhar, com a vareta de vidro previamente esterilizada com álcool, inflamada à chama e arrefecida no interior da placa.

4.4.3.2. Elaboração e colocação dos discos de antibióticos

Material

Papel de filtro
Furador
Lápis
Soluções de antibióticos
Placa com cultura fresca de *Bacillus cereus*
Pinça
Água destilada
Chama

Nota. Existem no mercado discos embebidos em antibióticos que podem adquirir-se no comércio de produtos químicos e colocar-se directamente sobre a placa previamente inoculada.

Execução

(Trabalhar junto à chama)

Furar o papel de filtro com o furador.

Aproveitar 5 dos discos obtidos, e marcar a lápis cada um com as seguintes letras:

- A - ampicilina
- B - bacitracina
- C - cloramfenicol
- P - penicilina
- T - tetraciclina

Colocar uma gota do antibiótico correspondente sobre cada um deles (**Fig. 14**).

Colocar os discos (papelinhos) na placa já inoculada, na ordem A, B, P, C, T, tendo o cuidado de lavar bem a pinça com água destilada entre a colocação de cada papelinho, pois existe a possibilidade de se misturarem os antibióticos.

Após 24 horas, observar e interpretar.

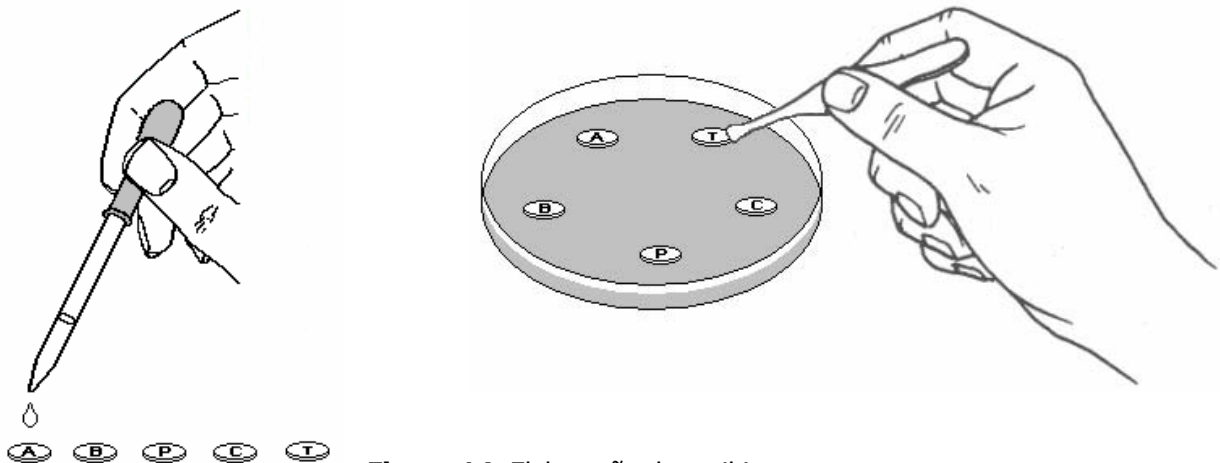


Figura 14. Elaboração de antibiogramas.

5. Sugestões para a adequação da execução dos trabalhos

5.1. Ensino Básico

5.1.1. Leveduras

Observar fermento de padeiro à vista desarmada, notando e registando a cor e a consistência.

Observar ao microscópio: numa lâmina pôr uma gota de água e adicionar, com um palito ou alfinete, um pouquinho do fermento de padeiro (a levedura *Saccharomyces*), de maneira a que a água adquira uma leve turvação; cobrir com lamela e seguir as instruções de utilização do microscópio. Registrar as observações com auxílio de desenhos.

Fazer placas de isolamento em meio de mel. Incubar, com a tampa para baixo, à temperatura ambiente até haver crescimento (2 a 7 dias, ou mais, conforme a temperatura, respectivamente de 30°C a 10°C). Observar a forma e cor das colónias, logo que sejam visíveis, e seguir o seu crescimento, registando as observações. Estimular a atenção dos alunos para o tamanho relativo das várias colónias na mesma placa, e tentar interpretar [em termos de diferenças das leveduras que originaram cada colónia, e da abundância de nutrientes].

Observar ao microscópio, em gotas de água separadas, as leveduras retiradas da margem duma colónia e as do centro. Comparar, notando que nas da margem se observam leveduras grandes (leveduras-mães) com outras mais pequeninas agarradas a elas (leveduras-filhas ou gémulas). É assim que as leveduras, que são seres vivos, se multiplicam.

Preparar massa de pão – farinha e água – em duas porções, juntando um pouco de fermento a uma das porções. Observar a evolução da massa e tentar explicar em termos da actividade das leveduras: fabricam gás que torna a massa mais leve.

5.1.2. Bactérias do iogurte

Observar um pouco de iogurte ou, simplesmente, uma gota da sua parte líquida, fazendo um esfregaço e deixando secar ao ar, ou cobrindo a gota com uma lamela.

Procurar bactérias redondas (*Streptococcus*) e bactérias alongadas (os mais raros *Lactobacillus*).

Pôr leite em dois copos (de iogurteira ou outros) e juntar um pouco de iogurte a um deles. Incubar na iogurteira ou deixar à temperatura ambiente, e observar no dia seguinte, descrevendo as observações. Comparar e tentar explicar as diferenças pela multiplicação e actividade das bactérias. Observar ao microscópio um pouco do conteúdo de cada um dos frascos. Verificar se essa observação apoia a explicação que foi dada.

5.1.3. Halobactérias do bacalhau

Observar as manchas vermelhas e as bactérias ao microscópio, numa gota de água salgada.

5.1.4. Antibiogramas

Fazer, de maneira simplificada, em tempo quente, à temperatura ambiente. Chamar a atenção para a especificidade dos antibióticos e para a necessidade de realizar antibiogramas antes de aplicar antibióticos no tratamento de doenças infecciosas.

5.2. Ensino Secundário

Todos os trabalhos podem realizar-se neste nível de ensino. Os professores escolherão e adequarão os trabalhos, segundo as necessidades específicas de programa e tempo disponível.

6. Avaliação comportamental

Um manual, como este, que resultou dum projecto aberto, não está necessariamente terminado. A aplicação mais generalizada dos protocolos sugeridos pode conduzir à preparação de exercícios práticos experimentais e de exercícios de inquérito científico, a utilizar junto dos alunos que realizaram os trabalhos, para avaliar comportamentalmente em que medida os objectivos foram atingidos. Estes exercícios terão de ser obviamente adequados a cada nível de aprendizagem. Espera-se que daí advenha eventual reformulação de estratégias, e adição de objectivos que se revelarem decorrentes.

Sugestão de tarefas:

Avaliar, fundamentadamente, as experiências levadas a cabo. Recordar resultados ou descrever outros relacionados com os assuntos em estudo. Apresentar hipóteses alternativas (devidamente formuladas), pedindo aos estudantes para escolher as que são apoiadas pelas observações. Levar os alunos a formular os conceitos, estimulando-os a darem explicações simples, distinguindo sempre entre observações e ideias explicativas.

Construir exercícios de inquérito, com base em sequências experimentais encadeadas, e intervaladas de questões pertinentes. Estimular a resolução de problemas, que vão surgindo, através de planeamentos experimentais simples. Pedir a elaboração de protocolos explicitamente destinados a objectivos específicos, por modificação de protocolos conhecidos.

6.1. Exemplo de exercício, a utilizar no ensino secundário

A orientação é conduzida pelo professor. Entre parênteses rectos, esquematizam-se respostas possíveis de dar pelos estudantes, que devem discutir-se, possibilitando a continuação do exercício.

6.1.1. Coexistem, presentemente, três sistemas de classificação para os seres celulares a um nível primário:

- classificação prática – reinos dos animais, das plantas, das algas, dos fungos, dos protozoários e das bactérias, correspondentes às disciplinas da biologia, respectivamente, zoologia, botânica, ficologia, micologia, protozoologia e bacteriologia;
- classificação estrutural – super-reinos dos eucariontes e dos procariontes;
- classificação molecular – domínios dos eucariontes, das eubactérias e das arquebactérias.

6.1.1.1. Procure informação respeitante aos fundamentos de cada uma destas classificações.

[classificação prática: anatomia, fisiologia, diferenciação celular; classificação estrutural: complexidade de estrutura celular; classificação molecular: ácidos nucleicos (principlamente rRNA) e proteínas]

6.1.1.2. Coloque, nos grupos de cada uma das classificações, os microrganismos estudados neste trabalho.

	classif. prática	classif. estrutural	classif. molecular	...]
leveduras	fungos	eucariontes	eucariontes	
bactérias do iogurte	bactérias	procariontes	eubactérias	
halobactérias do bacalhau	bactérias	procariontes	arquebactérias	

6.1.2. Encheram-se com leite seis boiões de iogurte e inoculou-se uma colher de chá de iogurte em cada um de três deles. Rolharam-se bem e incubaram-se os seis numa iogurteira, até ao dia seguinte.

6.1.2.1. Registaram-se as observações seguintes: nos três boiões onde se inoculou iogurte, o leite coalhou, tendo-se produzido iogurte fresco, ao passo que nos outros três o leite manteve-se líquido. Formule uma hipótese explicativa. [As bactérias do iogurte multiplicam-se no leite e transformam-no em iogurte]

6.1.2.2. O que é necessário fazer para fornecer novo apoio experimental a esta hipótese? [Observar ao microscópio amostras de todos os boiões]

6.1.2.3. Quais os resultados esperados? [Bactérias em forma de esferas e em forma de cilindros nos boiões com iogurte, e nenhuma bactérias nos outros]

6.1.2.4. Estes resultados apoiariam ou refutariam a hipótese anterior? [Apoiariam]

6.1.2.5. Imaginemos que apareceu coalhado o leite contido num boião, não-inoculado com iogurte, e deixado durante uma semana aberto, à temperatura ambiente. Formulem uma hipótese para esta observação. [Houve contaminação com bactérias do iogurte]

6.1.2.6. Planeiem uma experiência que teste esta hipótese. [Observar a textura do leite coalhado, apreciar o cheiro e também fazer uma observação ao microscópio]

6.1.2.7. À superfície do leite havia uma mancha rugosa. Ao microscópio não se encontraram bactérias mas leveduras. A hipótese foi apoiada ou refutada? [Refutada]

6.1.2.8. Formulem outra hipótese que seja apoiada por todas as observações (antigas e novas) respeitantes a este problema. [Há contaminação com leveduras e a actividade delas coalha o leite]

6.1.2.9. O leite coalhado, contaminado com leveduras, poderá ser consumido na alimentação? Porquê? [Não, porque não sabemos de que leveduras se trata, nem as transformações que produziram no leite]

6.1.2.10. Deixou-se que crescesse, durante mais uns dias, a tal colónia de leveduras contaminantes, e usou-se um pouco para inocular dois boiões de leite fresco. Deixou-se um deles à temperatura ambiente, desta vez tapado, e colocou-se o outro na iogurteira, durante três dias. Que resultados esperamos? [Que apareça crescimento nos dois boiões]

6.1.2.11. Somente no leite, que ficou à temperatura ambiente, se encontrou formação de película de leveduras, que foi apoiada por observação microscópica. No boião, que tinha sido deixado na iogurteira, não surgiram leveduras. Discuta estes resultados. [A temperatura da iogurteira é alta demais para o crescimento daquelas leveduras]

6.1.2.12. Como poderemos testar esta hipótese? [Repetir esta última experiência, com um meio de cultura mais apropriado para leveduras, como sumo de uva, pondo, desta vez também no frigorífico, um boião de sumo inoculado com leveduras, e boiões de sumo mas sem leveduras às outras temperaturas: ambiente e iogurteira]

6.1.2.13. Qual o papel do sumo sem leveduras?[Controlo da experiência]

6.1.2.14. Que resultados são de esperar? [Que só haja crescimento de leveduras no boião onde elas foram inoculadas, e que ficou à temperatura ambiente]

6.1.2.15. Se forem esses os resultados, que generalização podemos fazer, relativamente ao crescimento das leveduras em função da temperatura? [A temperatura da iogurteira é alta demais para o crescimento das leveduras e a temperatura do frigorífico é baixa demais]

6.1.2.16. Como se comportarão as bactérias do iogurte às mesmas temperaturas. [Devem crescer bem na iogurteira, crescer menos à temperatura ambiente e não crescer no frigorífico]

6.1.2.17. Planeiem uma experiência que teste essas previsões. [Boiões de iogurte com leite, inoculados ou não com um pouco de iogurte, e deixados à temperatura ambiente, na iogurteira, e no frigorífico]

6.1.2.18. Acham que as bactérias do iogurte resistiriam à temperatura de 100°C durante 5 minutos? [Não]

6.1.2.19. Mas conhecem-se bactérias que têm formas de resistência – esporos – resistentes a esse tratamento. Que importância prática tem o conhecimento destas formas de resistência? [Na esterilização de alimentos, como o leite, e na esterilização de instrumentos cirúrgicos]

6.1.2.20. Que informação retiraram deste exercício, relativamente ao processamento de alimentos e sua conservação, para se manterem livres de micróbios? [Bem cozinhados e conservados no frigorífico]

6.1.3 Experimentaram-se os antibióticos penicilina, cloramfenicol e ciclo-heximida, separadamente, no crescimento de culturas de leveduras, de bactérias do iogurte e halobactérias do bacalhau. Os resultados foram os seguintes:

	Penicilina	cloramfenicol	ciclo-heximida
Leveduras	criesceram	criesceram mal	não crieresceram
Bactérias do iogurte	não crieresceram	não crieresceram	criesceram
Halobactérias do bacalhau	criesceram	criesceram	criesceram

6.1.3.1. Discuta os resultados à luz dos alvos conhecidos para esses antibióticos: A penicilina inibe a síntese da parede das eubactérias, o cloramfenicol inibe a síntese proteica das eubactérias e das organelas dos eucariontes (mitocôndrias e cloroplastos), e a ciclo-heximida inibe a síntese proteica dos eucariontes (citoplásmica). [Os resultados estão de acordo com o esperado; a inibição das mitocôndrias das leveduras ainda permitiu algum crescimento com fermentação, uma vez que a respiração estaria bloqueada]

6.1.3.2. Qual dos sistemas classificativos, indicados em 1. É apoiado pela acção dos antibióticos? [O molecular]

6.1.3.3. Como se justifica a manutenção, presentemente, doutras classificações? [Comodidade relativamente às disciplinas da biologia, à estrutura das células, e importância relativa que se dá a certas características mais facilmente detectadas]

6.1.3.4. Esperaria produção de iogurte se se adicionasse penicilina ou cloramfenicol ao leite? [Não]

6.1.3.5. E se se adicionassem esses antibióticos ao bacalhau seco salgado, ver-nos-íamos livres das halobactérias? [Não]

6.1.3.6. Que reacção seria de esperar das células animais (incluindo as humanas), em tratamentos com penicilina, contra infecções bacterianas? [Nenhuma, se não houver alergia]

6.1.3.7. E de tratamentos com cloramfenicol? [inibição da síntese proteica mitocondrial]

6.1.3.8. Em que caso se justificaria o tratamento com cloramfenicol? [Se a bactéria infecciosa fosse resistente a todos os outros antibióticos que se conhece não terem efeitos secundários]

7. Publicações relacionadas para possível consulta

A. Madeira Lopes e Álvaro Fonseca. 1996. *Biologia Microbiana*. 183 páginas. Edição da Universidade Aberta, nº94.

A. Madeira Lopes, Álvaro Fonseca, João Almeida, Alexandra Veiga, M. Conceição Loureiro Dias, Ana Vieira. 1997. Duração: 55 minutos. *Videogramas de Biologia Microbiana*. Edição da Universidade Aberta.

Álvaro Fonseca e Amândio Madeira Lopes. 2003. *Biodiversidade*, Capítulo 1, pags. 3-31. In Nelson Lima e Manuel Mota (editores), *Biotecnologia*, 505 pag, Editora Lidel.

John Postgate. 2002. *Os micróbios e o homem* (versão portuguesa de Margarida Guerreiro, revisão científica de A. Madeira Lopes), 372 páginas. Editora Replicação.

José Batista Ascensão. 1994. *Elaboração de protocolos experimentais para o ensino de Ciências da Vida, utilizando fermento de padeiro*, 129 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho, Braga.

Wanda F. Canas Ferreira e João Carlos F. de Sousa (editores). 1998. *Microbiologia*, volume I, 342 páginas, Editora Lidel.