



UNIVERSIDADE
AbERTA
www.uab.pt

MÉTODOS EM MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Paula Bacelar Nicolau

2014



Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	2
2. RECOLHA DE AMOSTRAS	3
3. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	11
4. ENUMERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE MICRORGANISMOS	12
4.1 MÉTODOS DE CULTURA	12
4.1.1 MÉTODOS DE CULTURA PARA ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS	12
4.1.1.1 MEIOS DE CULTURA PARA BACTÉRIAS.....	17
4.1.2 MÉTODOS DE CULTURA PARA FUNGOS	19
4.1.3 MÉTODOS DE CULTURA PARA ALGAS E CIANOBACTÉRIAS	20
4.1.4 MÉTODOS DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS.....	20
4.2 MÉTODOS FISIOLÓGICOS	21
4.2.1 MÉTODOS DE ATIVIDADE MICROBIANA EM CULTURA PURA	21
4.2.2 MÉTODOS DE ATIVIDADE MICROBIANA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	24
4.3 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS	27
4.4 MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM ÁCIDOS NUCLEICOS	31
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	36

1. Introdução

A compreensão da estrutura e do funcionamento de um ecossistema requer o conhecimento não apenas das inter-relações que se estabelecem entre as diversas populações de organismos aí existentes, mas também o conhecimento quantitativo sobre números de organismos envolvidos, biomassa de populações, taxas de atividades, taxas de crescimento e de morte, bem como taxas de reciclagem de transferência de materiais dentro do ecossistema.

Números, biomassa e atividades são parâmetros ecológicos distintos, que embora correlacionados não devem ser utilizados como equivalentes, dado a sua extrapolação não ser linear. Embora o número de células microbianas pareça ser, à primeira vista, diretamente proporcional à biomassa e à atividade celular, isto nem sempre se verifica. Assim, por exemplo, a dimensão de uma célula varia em função da sua fase no ciclo de vida, e da existência de nutrientes; do mesmo modo, a biomassa varia em função dos mesmos parâmetros. Do mesmo modo, um fungo ou um actinomicete em fase de esporulação pode aumentar imensamente o seu número de células, mantendo-se, no entanto, a biomassa total. Quanto à atividade microbiana, esta apenas se correlaciona com números celulares ou biomassa numa situação em que as condições ambientais se mantenham inalteradas, ou seja enquanto não há alteração dos parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, nutrientes, etc.), o que considerando um ecossistema dinâmico (com os inúmeros fatores abióticos e bióticos) é difícil, senão impossível – em muitas situações - de prever.

Assim, a escolha do(s) parâmetro(s) a quantificar é feita em função da situação em estudo. Os dados quantificados obtidos, e eventuais extrapolações para outros parâmetros, devem ser analisados de modo crítico, e caso-a-caso.

Quando se procede à quantificação de microrganismos em sistemas naturais, há que ter em consideração a diversidade de microhabitats aí existentes, que têm como reflexo uma distribuição não homogénea das populações microbianas. Um maior conhecimento sobre o sistema permitirá escolher o procedimento mais adequado de amostragem.

O procedimento de quantificação dos microrganismos é composto de três fases: (i) recolha da amostra, (ii) processamento da amostra, (iii) quantificação de microrganismos. A escolha dos procedimentos associados a cada uma destas três fases pode influenciar grandemente o resultado final, sendo portanto importante de considerar o conjunto dos procedimentos para a análise e interpretação dos dados.

2. Recolha de amostras

O procedimento de recolha de amostras depende do tipo de ecossistema em estudo. O intestino de animais, a camada superficial de solos, águas de lagos e rios, e o sedimento dos fundos oceânicos são obviamente distintos e os procedimentos de recolha de amostras são determinados pelas suas características físicas e químicas, pela abundância de microrganismos esperada (face a estudos prévios) e pelos procedimentos de enumeração ou “medida” a ser usados (Tabela 1). Os procedimentos de recolha de amostras devem assegurar que os números ou atividades de microrganismos não são alterados, positiva ou negativamente, de um modo não quantificável durante a colheita da amostra. Devem ainda assegurar que as amostras são representativas e que não se encontram contaminadas com microrganismos externos ao ecossistema em estudo.

Tabela 1. Comparação das abordagens de amostragem microbiana nos principais ambientes naturais

Ambiente	Acesso	Números/ densidade	Equipamento de amostragem	Processamento da amostra para enumeração
Ar	direto	baixo	filtros, amostradores de Andersen, etc.	concentração sobre filtros
Água	direto ou remoto	elevado ou baixo	rede, frascos, filtros	diluição ou concentração
Sedimento	remoto	elevado	sondas	diluição em série
Solo	direto	elevado	pás / sondas	diluição em série

Amostras de solo e sedimento: A recolha de solos e sedimentos usa frequentemente uma abordagem não-estéril, com recurso, por exemplo, a pás ou enxadas, devido à abundância de microrganismos no solo comparativamente com a de possíveis contaminantes provenientes do ar ou dos recipientes de recolha, ex. sacos de plástico, frascos, baldes (Fig. 1). Quando é necessária a recolha de amostras de uma determinada profundidade, faz-se uso de uma *sonda de solo*, que muito frequentemente consiste de um tubo oco com uma extremidade fina, cortante, que pode ser manual ou necessitar de um motor para a sua introdução no solo (Fig. 1 (i)). As sondas para amostragem de solo são desenhadas de modo a minimizar a compactação do solo durante o processo de recolha de amostra. Espátulas estéreis podem ser utilizadas para afastar a camada exterior de solo, em contato com a sonda (para evitar contaminação), de modo a que apenas a parte interna de solo seja usada para análise.



Fig. 1 - Exemplo do equipamento utilizado na amostragem de solo e sedimentos: diversos tipos de sondas (a) a (c), martelo (d), pá, enxada (f, g), balde (h); entrada de sonda de 60 cm de comprimento no solo (i); sonda de aço, aberta, com solo no seu interior (j).

É frequentemente necessário misturar várias amostras, para fazer uma *amostra composta* (pois os solos podem representar um habitat heterogéneo) que é armazenada para análise posterior.

Por vezes a colheita de amostras é feita de acordo com um padrão de amostragem delineado para o efeito. A amostragem pode ser (a) *aleatória* (envolve a escolha aleatória de um número de pontos de amostragem na área em estudo, que são

amostrados até à profundidade definida), (b) *em transeto* (envolve a recolha de amostras ao longo de uma linha diretora), (c) “*two-stage*” (quando uma área de estudo é dividida em subunidades regulares; em cada subunidade podem retirar-se amostras aleatórias ou em grelha), e (d) *em grelha* (amostras retiradas sistematicamente a intervalso regulares e espaçamento fixo) (Fig. 2).

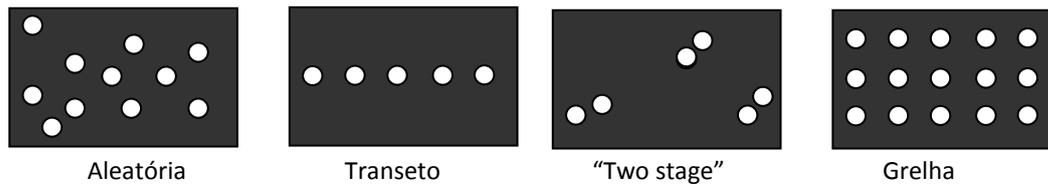


Fig. 2 - Possíveis padrões espaciais de amostragem de solo.

A amostragem de microrganismos presentes no solo em densidade/número reduzido pode necessitar do uso de “atratores” ou de “isco”. Por vezes, é suficiente a colocação de uma superfície que, por absorção, concentra de modo natural os nutrientes dissolvidos, e simultaneamente ou conseqüentemente, ou microrganismos também aí presentes. Esta superfície pode consistir de um pequena lâmina de vidro limpo (lâmina de microscópio; Fig. 3). Assumindo que a sua superfície absorve de um modo não-seletivo e atua como a superfície das partículas minerais do solo, os tipos e proporções de organismos que aderem à lâmina podem considerar-se representativos da comunidade microbiana aí presente e são facilmente observáveis sob o microscópio óptico. Uma variação desta *técnica da lâmina enterrada* é a exposição de grelhas de microscópio eletrónico nos ambientes naturais. Estas grelhas, depois de recolhidas, são observadas diretamente ao microscópio eletrónico, o que possibilita obter um maior detalhe da morfologia microbiana, comparativamente com a microscopia óptica. Ainda uma outra variação da técnica da lâmina de vidro enterrada substitui a lâmina de vidro por um capilar, achatado, de vidro. Este sistema é designado por *pedoscópio*. Estes capilares assemelham-se a espaços porosos do solo e os microrganismos têm acesso ao seu interior de modo livre. A superfície achatada do capilar de vidro possibilita a fácil observação e contagem de microrganismos ao microscópio. Os capilares podem também ser previamente preenchidos por uma solução nutritiva que atrai os microrganismos, caso em que a técnica se assemelha a uma cultura de

enriquecimento e conseqüentemente não reflete a composição original da comunidade microbiana natural do ecossistema.

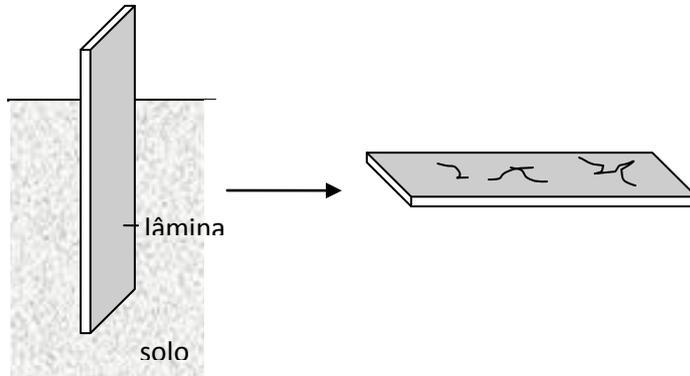


Fig.3 - Representação esquemática da técnica da lâmina enterrada para recolha e enumeração de microrganismos (adaptado de Atlas e Bartha, 1993).

Amostras de água: As amostras de água têm geralmente um número de microrganismos inferior ao encontrado em solos e sedimentos. O processo de recolha da amostra requer, assim, frequentemente (i) condições de esterilidade (para evitar contaminação potencial de outros habitats) e (ii) equipamentos de recolha remota. Diversos equipamentos são utilizados na recolha remota de amostras de água (ex. garrafas de Van Dorn, garrafas de Niskin; Fig. 4), que garantem que estas são recolhidas de uma dada profundidade na coluna de água. A recolha de amostras de água a profundidades maiores requer a utilização de sistemas especializados, adaptados a situações de descompressão durante a recuperação das amostras (usados por exemplo nos submarinos de profundidade, como o *Alvin*). Volumes de água entre 1 mL e 1000 L são geralmente recolhidos. É necessário adequar a concentração de microrganismos (por concentração ou por diluição) de modo a poder quantificá-los.

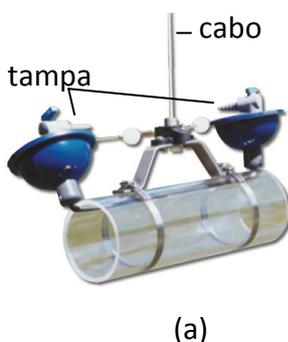


Fig. 4 - Equipamentos de recolha remota de amostras de água: (a) garrafa de Van Dorn, (b) garrafa de Niskin. As tampas na extremidade dos dois tipos de garrafas mantêm-se abertas até ser largado um “mensageiro”, pelo cabo que as segura (quando é atingida a profundidade requerida), e cujo embate as liberta, fechando rapidamente as garrafas e aprisionando a amostra de água.

Análise de partículas virais. Os vírus são encontrados em números reduzidos nas amostras de água e o procedimento para a sua recolha é longo. Há quatro fases na análise de partículas virais em amostras de água: (i) *recolha de amostra* (100 a 1000 L) que é concentrada por filtração em filtros específicos para a concentração de vírus (ex. filtros VIRADEL, “Virus Adsorption-Elution”; para adsorção e eluição de vírus), (ii) *eluição* das partículas virais recolhidas no filtro, (iii) *reconcentração* para redução do volume de amostra e (iv) *deteção viral* por métodos de cultura celular ou por métodos moleculares como o PCR (“Polymerase chain reaction”).

Análise de bactérias. Os recipientes de amostragem bacteriológica em águas devem ser passíveis de esterilização e incluem sistemas de câmaras em vácuo que podem ser abertas a uma determinada profundidade, recolhendo assim apenas água desse ponto na coluna de água (ex. saco de Niskin, amostrador J-Z¹; não mostrado). As bactérias são recolhidas em recipientes esterilizados e enumeradas por um de dois métodos: (i) filtração sobre membrana, (ii) técnica do número mais provável (MPN, “Most probable number”). Em ambos os métodos as bactérias são detectadas por métodos de cultura (ver secção 4.1).

Análise de algas e protozoários planctónicos. A recolha de amostras para enumeração de algas e/ou protozoários é frequentemente efetuada com recurso a garrafas de Van Dorn e de Nansen, ou a redes Bongo (Fig. 5), com malha de dimensão apropriada, puxadas por barcos, que conduzem os organismos planctónicos através de um funil para frascos de amostragem onde são concentrados (Fig. 5).

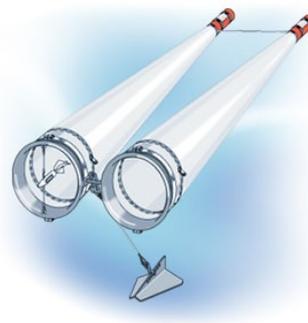


Fig. 5 – Redes Bongo (foto e representação esquemática) filtram as águas de superfície na coluna de água até um máximo de 10 m de profundidade. Os frascos de amostragem, no esquema, estão representados a vermelho.

¹ Amostrador J-Z consiste de um frasco de vidro, ou bolbo de borracha comprimido, sob vácuo, ligado a um tubo de vidro selado, para entrada de água. O aparelho é baixado até à profundidade desejada e é largado um mensageiro/peso que quebra a ligação de vidro permitindo a entrada de água no compartimento sob vácuo. Um sistema alternativo é o saco de Niskin.

Amostras de ar: O número de microrganismos presentes no ar é geralmente reduzido e dada a impraticabilidade de recolha de grandes volumes de ar, os processos de recolha de amostras e o seu processamento para enumeração de microrganismos são feitos de modo acoplado. Existem diversos equipamentos de recolha de ar cuja escolha depende dos custos associados, volume de ar a ser amostrado, mobilidade, eficiência da amostragem, condições ambientais nas quais é feita a amostragem. No caso de amostragem de microrganismos deve também ter-se em consideração o efeito do processo de amostragem na viabilidade microbiana durante e após a sua recolha. Os diferentes tipos de equipamentos para recolha, quantificação e deteção de bioaerossóis baseiam-se em diferentes princípios e métodos de amostragem: colisão, impactação, centrifugação, filtração e deposição.

Filtração e deposição. Estes dois métodos são muito utilizados para amostragem de microrganismos no ar devido ao seu relativamente baixo custo associado e portabilidade dos equipamentos. O processo baseado em filtração requer uma fonte de vácuo que envolve a passagem do ar através de um filtro – de dimensão de poro adequado - onde as partículas são recolhidas. Os filtros são “lavados” para remoção dos microrganismos para análise posterior. A amostragem por deposição consiste na exposição ao ar de uma placa de Petri com o meio sólido adequado. É o método com menor custo associado, mas também o de menor eficiência na amostragem. A deposição de partículas do bioaerossol resulta na impactação direta, por ação de forças de deposição naturais (gravidade e outras forças).

Impactação. Consiste na deposição forçada de partículas presentes no ar, numa superfície sólida. Os diversos equipamentos utilizam uma força de sucção para capturar as biopartículas presentes no ar que subsequentemente são “depositadas” num material adesivo (ex. gel de glicerina) na superfície de uma lâmina de vidro ou num meio de crescimento sólido, adequado, contido numa placa de Petri. As placas de Petri são cobertas por um filtro ou crivo com poro/malha de determinada dimensão. Um exemplo comum destes equipamentos é a armadilha volumétrica de Burkard (Fig. 6); funciona com um fluxo de ar de entre 10 a 20 l/min. No amostrador volumétrico de

seis níveis de Andersen (Fig. 7) o ar é puxado através de um orifício e embate, sucessivamente, em seis placas de Petri contendo meio sólido. As seis placas de Petri estão separadas por filtros cuja dimensão de poro é gradualmente mais pequena. Assim, as partículas de maior dimensão são coletadas, por impacto, no primeiro nível/placa e cada nível seguinte coleta partículas de dimensão gradualmente menor. À medida que o fluxo de ar passa sequencialmente de um nível para o seguinte, a velocidade do fluxo aumenta e, assim, aumenta também progressivamente o potencial de impacto das partículas menores.

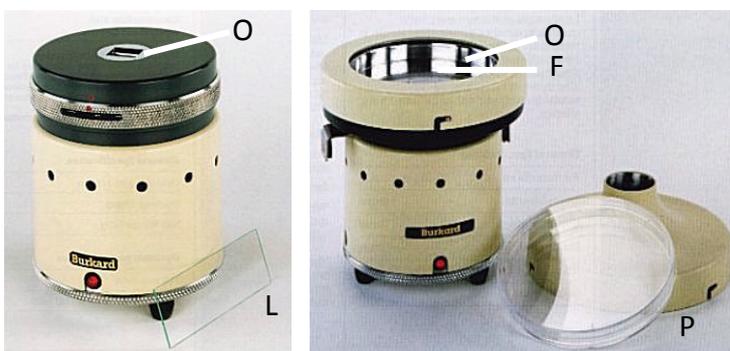


Fig. 6 - Armadilha volumétrica de Burkard: (a) modelo para lâmina e (b) modelo para placa de Petri. L-lâmina de vidro; O-orifício de entrada de ar; P-placa de Petri; F-filtro (retirado de burkard.co.uk/portsamp.htm).



Fig. 7 - (a) Amostrador volumétrico de Andersen de seis níveis; (b) Crescimento de colónias de microrganismos nos seis níveis sucessivos de um amostrador Andersen (<http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/3989/eopr-3989.asp>).

Colisão. Consiste na recolha e captura das partículas presentes no ar numa matriz líquida. De entre os equipamentos baseados neste método, o mais utilizado é o AGI-30 (“All-Glass Impinger” Fig. 8). Este equipamento é referido como um amostrador standard de referência. É feito de vidro, permite uma fácil esterilização, e tem uma boa

eficiência na amostragem de biopartículas de dimensões entre 0,8 e 15 μm . O AGI-30 funciona geralmente com uma força de sucção, por ação de uma bomba de ar, com uma taxa de fluxo de ar 12,5 l/min, e com um volume de meio líquido de recolha de 20 ml. Pode utilizar todo o tipo de meios líquidos, desde soluções simples a meios complexos, meios de enriquecimento ou definidos, para a deteção de microrganismos específicos. Neste aparelho, o ar é “puxado” através de um tubo, semelhante na forma ao orifício nasal humano, e é transmitido através de um meio líquido, onde as partículas ficam “presas”. Uma limitação do amostrador AGI-30 é o facto de não permitir separação baseada no tamanho das biopartículas.



Fig. 8 - Amostrador de vidro SKC, semelhante ao AGI-30 (retirado de <http://www.airmet.com.au>).

Amostras biológicas: O tipo de procedimento de recolha de microrganismos em tecidos biológicos depende do microrganismo e do local onde se encontra, e pode envolver a simples recolha de fluidos vitais (ex. sangue ou seiva vegetal), a dissecação para recolha de determinados tecidos (ex. fígado), a recolha de produtos excretados (ex. matéria fecal), ou a recolha sobre a superfície externa de organismos. Quando a superfície de recolha é externa, como no caso da folha de uma planta ou superfície de dente, os microrganismos podem ser lavados ou raspados do tecido foliar ou do dente com o uso de soluções estéreis ou o uso de “swabs” de algodão estéreis. Noutras situações poderá ser necessária a recolha e preservação de uma amostra do tecido ou material biológico onde se aloja(m) o(s) microrganismo(s) para possibilitar a sua análise.

3. Processamento da amostra

Após recolha da amostra, o seu processamento ulterior inclui o transporte e preservação da amostra até ao laboratório, bem como o processo de determinação/quantificação de microrganismos ou da sua atividade metabólica propriamente dito.

De um modo geral, as populações de microrganismos que ocorrem em ambiente natural existem em concentrações que não são ajustadas aos métodos de determinação e deteção usuais, sendo assim necessário concentrar ou diluir as amostras recolhidas. Amostras com número elevado de microrganismo podem ser diluídas por *diluições em série*. A concentração de amostras com um número reduzido de microrganismos pode ser feita por *centrifugação* ou por *filtração* em filtros de diâmetro de poro adequado. Filtros com poros muito largos não recolhem os microrganismos, enquanto que poros muito pequenos são facilmente obstruídos e, assim, incapazes de filtrar o volume necessário para concentrar efetivamente a amostra.

Se os métodos de determinação quantificam os números totais de microrganismos, não discriminando entre os vivos e os mortos, as amostras podem ser preservadas adicionando um agente fixador², como o glutaraldeído ou o formaldeído.

Se os métodos de determinação pretendem quantificar microrganismos viáveis, presentes na amostra, o tempo de processamento deverá ser o mais curto possível, e as condições que medeiam entre a recolha da amostra e a sua determinação deverão afetar o menos possível as atividades dos microrganismos. Cada grupo de microrganismos presente na comunidade microbiana apresenta diferentes requisitos fisiológicos (ex. grupos de anaeróbios, microaeróbios, psicrófilos, acidófilos, etc.) aos quais se deve ter atenção quando se quantificam os diferentes grupos de microrganismos: as condições (ex. temperatura, concentração de oxigénio, Eh, etc.) existentes durante as fases de processamento entre a recolha e o procedimento de

² Os aldeídos, e em particular o formaldeído e o glutaraldeído, têm a capacidade de fazer ligações químicas cruzadas com os grupos amino das proteínas. Este processo, conhecido por fixação, impede a desintegração e degradação das estruturas celulares, paralisa o metabolismo celular, impede a proliferação de microrganismos, e leva ao endurecimento do tecido para que resista aos tratamentos posteriores.

enumeração/deteção devem ser ajustadas. Para além disso, o crescimento microbiano é um processo rápido nos recipientes de colheita, e em particular quando tratamos de amostras de água.

4. Enumeração e determinação de atividade de microrganismos

Nos estudos de ecologia microbiana e microbiologia ambiental há dois aspetos importantes a considerar: (i) a *biodiversidade*, incluindo o isolamento, identificação e enumeração de microrganismos nos seus habitats, e (ii) a *atividade microbiana*. Embora relacionados, estes dois aspetos nem sempre estão correlacionados. Quando se interpretam os resultados de enumeração e determinação de atividades é necessário ter em conta, por um lado, as limitações inerentes às metodologias utilizadas, e por outro lado, o facto das atividades microbianas serem um reflexo do seu estado fisiológico (que é afetado pelas condições físicas, químicas e biológicas do meio em que se insere).

4.1 Métodos de cultura

Nos métodos de cultura a enumeração de microrganismos é feita com base na contagem do número de células viáveis. É, assim, necessário determinar qual o microrganismo ou grupo de microrganismos a quantificar e o meio apropriado ao seu crescimento. Os métodos para enumerar bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus são distintos.

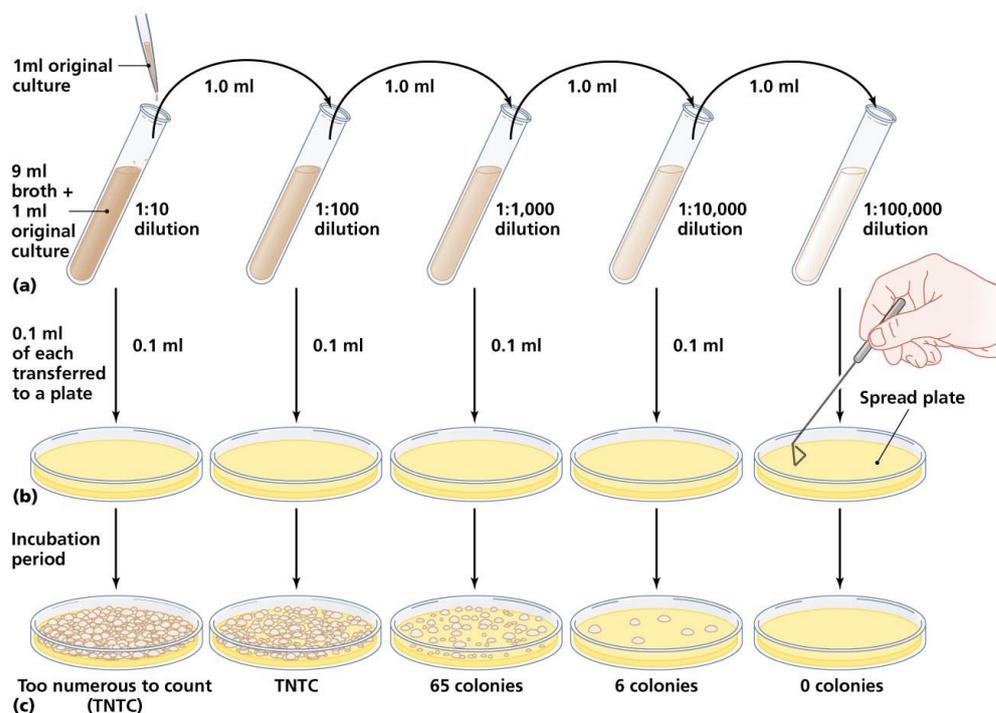
4.1.1 Métodos de cultura para enumeração de bactérias

Os dois métodos básicos para enumeração de números viáveis de bactérias são (i) a *contagem de colónias em meios sólidos* (ou “unidades formadoras de colónia”, UFC, ou do inglês “Colony forming units”, CFU) e (ii) a *técnica do número mais provável* ou *técnica NMP* (do inglês “Most probable number”, MPN).

Diluição em série de uma amostra

É frequentemente necessário diluir as amostras em estudo para poder quantificar/ enumerar o número de bactérias através da *técnica de diluição em série* (Fig. 9). Nesta,

1 mL da amostra a quantificar é diluído pela adição de 9 ml de uma solução esterilizada adequada (água, tampão fosfato, solução salina, etc.) resultando numa diluição de 1:10 (v/v) ou 10^{-1} da amostra original (ou seja a amostra original é diluída para 1/10). De modo semelhante preparam-se as diluições em série 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}), 1:10.000 (10^{-4}), 1:100.000 (10^{-5}), etc. No fim, uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição é retirada e plaqueada no meio sólido adequado. Os meios são incubados nas condições adequadas ao crescimento das bactérias em análise. O número de colónias que cresce em cada meio permite calcular a concentração de bactérias presente na amostra original, multiplicando-o pelo *fator de diluição*.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 9 - Procedimento para preparação de diluições em série a partir de uma amostra de água e contagem de colónias em meio sólido.

As amostras de água marinha ou água potável que contêm números baixos de bactérias, em vez de diluídas, necessitam de ser concentradas. A concentração de bactérias pode ser feita filtrando um determinado volume de amostra através de filtros de poro adequado. Os filtros com as bactérias nele coletadas são colocados sobre um meio sólido de modo a permitir o crescimento de colónias. Este procedimento é conhecido como *técnica da membrana filtrante* (Fig. 10).

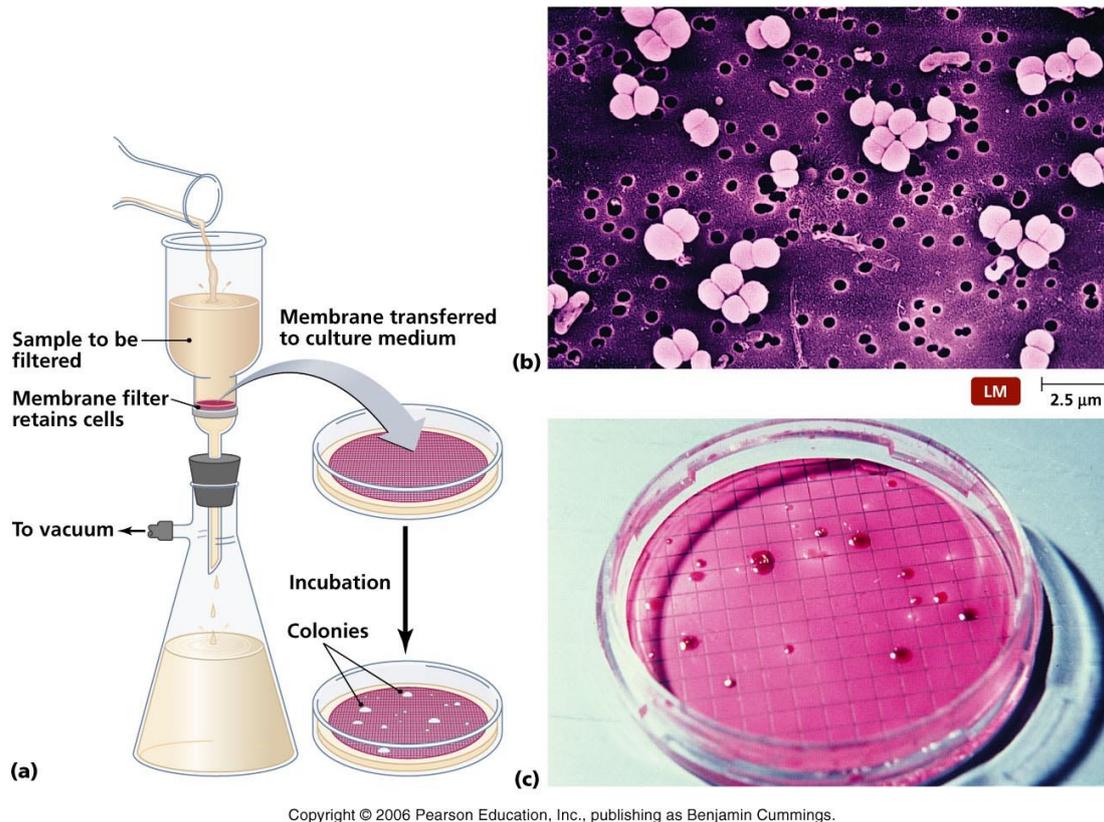


Fig. 10 – Técnica da membrana filtrante. O filtro estéril (a) é colocado num suporte de filtração, onde a amostra de água é adicionada e filtrada por vácuo. O filtro contendo as bactérias concentradas (b) é posteriormente incubado nas condições adequadas ao desenvolvimento de colónias (c).

Métodos de plaqueamento

Após concentração ou diluição a amostra é adicionada em placa de Petri contendo um meio sólido de crescimento. Existem três métodos básicos para aplicação da amostra em meio sólido: (i) *espalhamento em superfície* (“spread plate”), (ii) *espalhamento em profundidade* (“pour plate”) e (iii) *método das estrias*.

No método das estrias uma pequena alíquota de amostra é transferida para a superfície do meio sólido e espalhada (riscando a superfície do meio) com uma ansa de inoculação, de modo a que seja feita uma diluição progressiva da amostra e a obter, na fase final, colónias isoladas (Fig. 11). A ansa deve ser esterilizada entre cada série de estrias de modo a garantir a diluição da amostra e a obtenção das colónias isoladas. É uma técnica comumente usada para a obtenção de colónias isoladas e de culturas puras de microrganismos. As colónias isoladas podem, então, ser retiradas com uma ansa esterilizada e espalhadas em meio sólido novo para garantir a pureza da colónia.

No plaqueamento em superfície a amostra de água a enumerar é adicionada na superfície do meio sólido e espalhada uniformemente com a ajuda de um espalhador de vidro esterilizado (Fig. 12). No plaqueamento em profundidade, a amostra a analisar é diluída, e misturada, no meio de agár (a 45 °C) antes de este solidificar, ficando assim englobada diretamente nele (Fig. 12). As colónias podem desenvolver-se à superfície ou em profundidade no meio. É uma técnica útil, por exemplo, para o crescimento de algumas bactérias microaerofílicas.

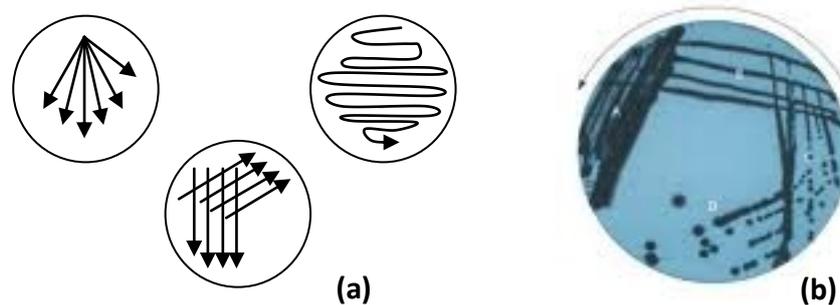


Fig. 11– (a) Alguns modos de espalhar o inóculo na superfície do meio sólido pelo método das estrias. As setas indicam a direção do estriamento. (b) Exemplo de uma placa com colónias isoladas com o método das estrias; A, B, C, D representam os 4 etapas de estrias sucessivas.

Método do número mais provável (NMP)

Esta técnica permite estimar o número de microrganismos que estão presentes numa amostra original, através do crescimento de bactérias viáveis em meio líquido. Nesta técnica, à semelhança do plaqueamento em meio sólido, faz-se uma diluição seriada da amostra original, após o que se adicionam alíquotas destas diluições em série a meios líquidos apropriados (Fig. 13). O método baseia-se na diluição até à extinção da população microbiana presente na amostra, seguida da inoculação de 3 a 10 tubos replicados, de cada uma das diluições preparadas, em meio líquido. Os tubos são incubados para crescimento dos microrganismos e após um período de incubação que pode variar entre poucos dias, (ex. bactérias heterotróficas aeróbias) a alguns meses (ex. bactérias oxidantes de nitrito, bactérias nitrato-redutoras, etc.), dependendo do microrganismo em causa, analisam-se os tubos para a existência ou não de

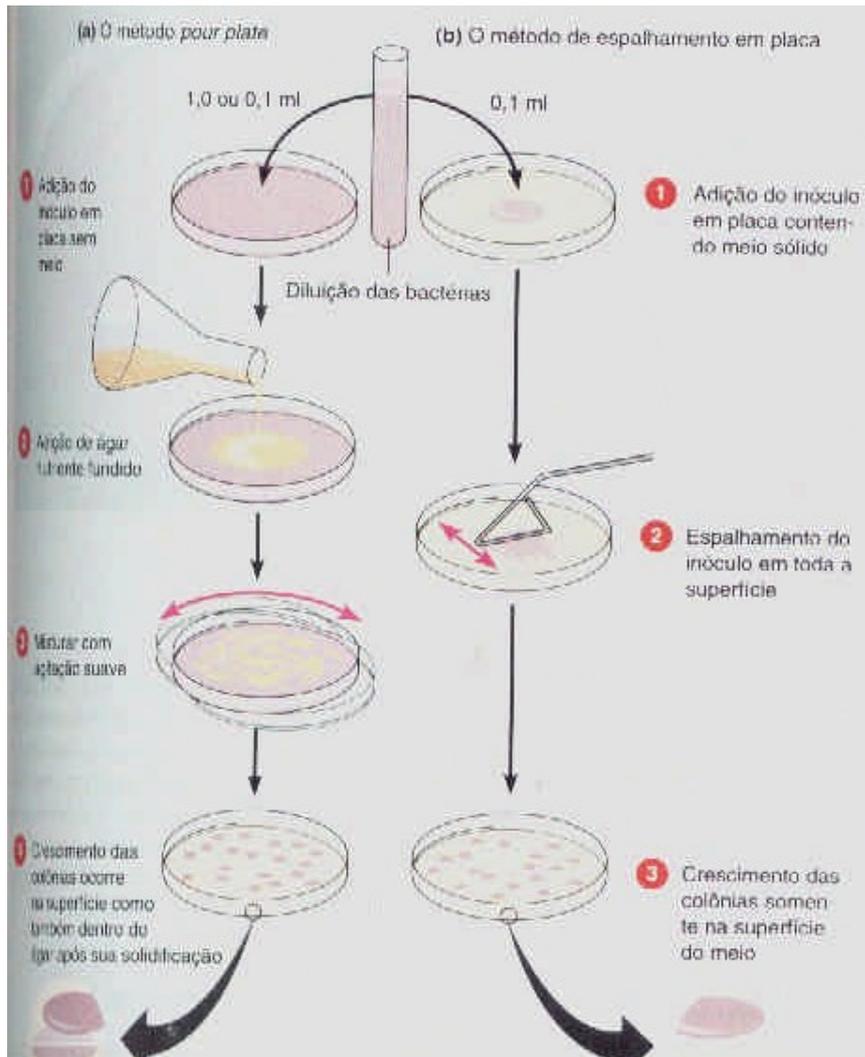


Fig. 12 – Representação esquemática das técnicas de espalhamento em profundidade e espalhamento em superfície.

crescimento. A ocorrência de crescimento e a ausência de crescimento são marcadas +/- , respetivamente, na base da deteção de crescimento por exemplo por turbidimetria, produção de gás, desaparecimento de substrato, etc. O número de tubos positivos e negativos de cada diluição é usado para determinar o *número de microrganismos mais provável* que se encontrava na amostra original (não diluída) através do uso de tabelas estatísticas de valores de NMP (APHA, 1998).

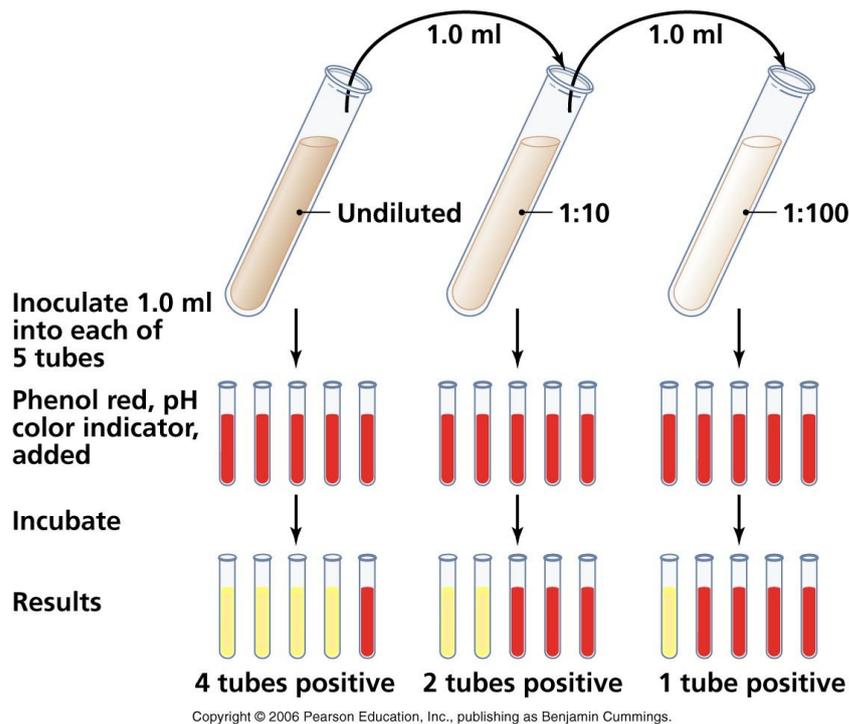


Fig. 13 – Representação esquemática do método do número mais provável (NMP) para enumeração de bactérias. A amostra ambiental é diluída até à extinção. As amostras diluídas são usadas para inocular tubos, em replicado (neste caso 5 réplicas). A presença ou ausência dos microrganismos de interesse numa dada diluição da amostra original pode ser analisada estatisticamente para estimar a população original na amostra ambiental.

4.1.1.1 Meios de cultura para bactérias

Os meios de cultura podem ser líquidos (sem agente solidificante, geralmente agar), semi-sólidos (com algum agar, mas não o suficiente para que o solidifique) e sólidos. Os meios de cultura permitem o isolamento, o crescimento e a manutenção de microrganismos no laboratório.

Os dois tipos principais de meios de cultura são (i) *meios basais ou simples* para as bactérias heterotróficas comuns e (ii) *meios de enriquecimento* para o isolamento de um tipo de microrganismo particular a partir de uma cultura mista ou de uma amostra ambiental.

Contagens de heterotróficos em placa

Para as bactérias heterotróficas comuns podem ser utilizados dois tipos básicos de meios: (i) **meios de cultura complexos** (ricos) e (ii) os **meios pobres** ou **meios mínimos**. Exemplos de meios de cultura complexos são o meio de agar nutritivo, meio de agar de

peptona-levedura ou o agar de extrato de solo aditivado de glucose ou peptona. Um meio pobre contém até 25% dos nutrientes presentes num meio complexo (ex. meio de levedura, meio de peptona). Exemplos de meios mínimos são o agar R2A (Difco), agar m-HPC (Difco) e agar de extrato de solo sem aditivos.

Meios para microrganismos específicos

Os **meios de enriquecimento** são meios líquidos cuja composição nutricional, conjuntamente com as condições de crescimento, promovem o crescimento de determinado tipo fisiológico de microrganismo, presente numa mistura de microrganismos, ao mesmo tempo que suprimem o crescimento dos microrganismos competidores. Os meios de enriquecimento podem ser de dois tipos: (i) *meios de enriquecimento eletivos*, se permitem o crescimento de um único, ou um de um tipo limitado de microrganismos, ou (ii) *meios de enriquecimento seletivo* se envolvem a adição de substâncias inibitórias (ex. antibióticos diversos como o cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, penicilina, etc.) ou condições que suprimem o crescimento da maioria dos microrganismos, com a exceção do microrganismo que se pretende seleccionar.

Os **meios especializados de isolamento** contêm uma formulação que vai ao encontro dos requisitos nutricionais de um determinado grupo de microrganismos, como *Staphylococcus* ou *Corynebacterium*. Os **meios diferenciais** contêm substâncias que permitem distinguir entre diversos microrganismos que crescem no mesmo meio. Incluem um indicador, geralmente de pH.

Seguidamente indicam-se alguns procedimentos para o isolamento de microrganismos específicos:

Coliformes fecais na água. A amostra de água é filtrada usando a técnica da membrana filtrante. Esta membrana é inoculada no meio de agar m-FC (Difco) e incubada a 45 °C durante 24 horas. As colónias azuis correspondem a bactérias coliformes, enquanto que as colónias não-coliformes se desenvolvem com uma cor entre o creme e o cinzento. As coliformes fecais podem ser isoladas num meio de enriquecimento de lactose aditivado com 1% de ácido rosálico para inibir o

crescimento de não-coliformes, e com uma temperatura inicial de incubação elevada, fator crítico na seleção de coliformes fecais (APHA, 1998).

Microrganismos nitrificantes do solo. *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são isolados através de um procedimento longo. Este inclui enriquecimento de solo, uma cultura de enriquecimento inicial e várias verificações rigorosas de pureza. *Nitrobacter* spp. pode também ser estimado pelo método NMP, num meio contendo tampões de potássio, sais de Mg, elementos essenciais, Fe, NaNO_2 e azul de bromofenol, como indicador. A cor muda de azul para amarelo pela oxidação de NH_4^+ a NO_2^- .

Bactérias do solo que degradam o herbicida 2,4-D. Um meio de enriquecimento, seletivo, diferencial, chamado agar de eosina-azul de metileno-2,4-D é usado para estas bactérias. Este meio contém uma mistura salina mínima, e 2,4-D como fonte de carbono. Os indicadores eosina B e azul-de-metileno permitem seleccionar para bactérias Gram-negativas e diferenciar as colónias de bactérias que degradam o 2,4-D, que são de cor preta.

4.1.2 Métodos de cultura para fungos

Os métodos de cultura para enumeração de fungos são semelhantes aos utilizados para bactérias, mas necessitam da adição de compostos químicos inibidores do crescimento de bactérias (ex. antibióticos ou corantes como o Rosa Bengal), para evitar o erro associado ao crescimento destas últimas. Apesar do seu uso frequente para enumeração de fungos, a análise por plaqueamento e a diluição quantitativa não dá resultados tão fiáveis como os obtidos com bactérias. Ao contrário do que sucede com bactérias, em que cada unidade formadora de colónia corresponde geralmente a uma célula única, nos fungos cada unidade formadora de colónia é frequentemente um fragmento de hifa, contendo mais de uma célula viável, ou agregado de esporos, para além do esporo único. Os fungos são cultivados por espalhamento em profundidade, espalhamento em superfície e técnicas de filtração de membrana (APHA, 1998).

4.1.3 Métodos de cultura para algas e cianobactérias

As algas e cianobactérias podem ser enumeradas pelas técnicas de diluição e plaqueamento, bem como pelo método de MPN, com algumas alterações. As algas filamentosas presentes em amostras de solo necessitam de ser maceradas num almofariz antes de extração ou de uma forte homogeneização num equipamento de homogeneização com contas de vidro. Antibióticos como a penicilina e a estreptomicina são adicionadas para evitar o crescimento de bactérias e fungos em meio de crescimento sólido. Após inoculação, os meios de crescimento para a sua enumeração necessitam tipicamente de incubação entre 1 a 3 semanas, a 20-25°C, e com um fotoperíodo fixo, ex. 12 h luz – 12 h escuro ou 16 h luz – 8 h escuro (APHA, 1998).

4.1.4 Métodos de deteção e quantificação de vírus

Os dois métodos mais comuns de deteção e quantificação de vírus são (i) o método de *efeito citopatogénico* e (ii) o método da *unidade formadora de placa*. Ambos os métodos se baseiam na utilização de *culturas celulares contínuas* cujas linhas celulares (obtidas a partir de diversos tipos de tecidos vivos) são sub-cultivadas indefinidamente. Culturas destas linhas celulares crescendo em monocamada, sobre um meio nutritivo sólido, são inoculadas por espalhamento superficial de uma suspensão viral.

A deteção e enumeração de partículas virais, quando feitas pelo método do efeito citopatogénico, baseiam-se na deteção de alterações observáveis nas células hospedeiras devido à replicação viral. Estas alterações - efeitos citopatogénicos – incluem o arredondamento celular, formação de células gigantes, ou formação de “buracos” na monocamada celular (devido a lise celular); diferentes vírus produzem efeitos citopatogénicos distintos. A deteção e enumeração de partículas virais pelo método da unidade formadora de placa baseia-se na formação de “placas”, ou zonas de lise, quando as suspensões virais são espalhadas sobre um meio sólido contendo uma monocamada de células, suas potenciais hospedeiras; cada halo de lise resulta da infeção de uma célula por uma partícula viral. A quantidade de partículas virais em suspensão pode ser estimada a partir da contagem do número de “placas” de lise, ou

unidades formadores de placas (UFP), e tendo em conta o volume de suspensão espalhado. Este método de enumeração pode ser visto como um método análogo ao método de unidades formadoras de colónias (UFC) de bactérias.

4.2 Métodos fisiológicos

Nesta secção são descritos vários métodos para a medição da atividade de microrganismos, tanto em cultura como em amostras ambientais.

4.2.1 Métodos de atividade microbiana em cultura pura

A atividade microbiana de uma cultura pura é um bom indicador de medida. Entre os métodos utilizados para medir a atividade microbiana destacam-se (i) utilização de substrato, (ii) utilização de aceitador de eletrões terminal, (iii) aumento de massa celular, (iv) produção ou utilização de CO₂.

Utilização de substrato. O crescimento de uma cultura pode ser medido pela utilização do substrato de crescimento (Fig.14). Por exemplo, no caso da atividade heterotrófica, o substrato é um composto de carbono (glucose ou outro) cuja presença pode ser medida por uma diversidade de métodos (dependendo da suas características químicas) como a espectrofotometria de UV, a fluorimetria, cromatografia em fase gasosa (GC) ou espectrofotometria de massa. No caso de microrganismos quimioautotróficos, diferentes compostos são utilizados ... e medidos. Por exemplo, nos processos de nitrificação (oxidação da amónia) e da oxidação de enxofre medem-se, respetivamente, os produtos de nitrificação de amónia-¹⁵N (produtos-¹⁵N, por espectrofotometria de massa) e os sulfatos formados (por espectrofotometria de absorção atómica).

Aceitadores terminais de eletrões. Uma variedade de aceitadores terminais de eletrões podem ser usados para determinar a atividade microbiana, a qual se reflete no seu desaparecimento ou no aparecimento da forma reduzida do aceitador terminal de eletrões. A grande maioria das atividades microbianas é medidas em condições de aerobiose, sendo O₂ o seu aceitador terminal de eletrões. Dado que a medição de níveis de O₂ em soluções aquosas é - metodologicamente - um processo rápido,

rotineiro e barato, o “nível de O₂” tornou-se um parâmetro extensamente utilizado em análises de qualidade de água, através do indicador de *Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO)* que corresponde à quantidade de oxigénio consumido na degradação da matéria orgânica por processos biológicos.

Biomassa celular. O aumento de biomassa celular é uma forma de quantificar os microrganismos numa amostra. Isto pode ser feito por (i) *contagem de unidades viáveis* (colónias que se desenvolvem em meio sólido; Fig. 9, Fig. 10, Fig.11), (ii) *contagens diretas em microscopia* (corresponde ao número total de células presentes - viáveis, não-viáveis e mortas; Fig. 15), (iii) *turbidimetria* (ou densidade óptica da suspensão celular, Fig. 16) e (iv) *doseamento de composto químico celular*, (frequentemente o seu conteúdo proteico, utilizando métodos standard).

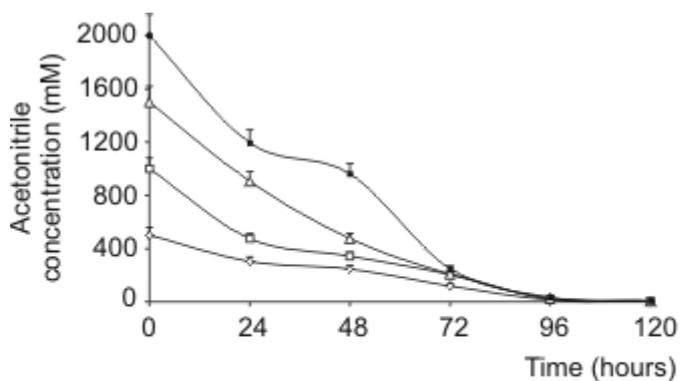
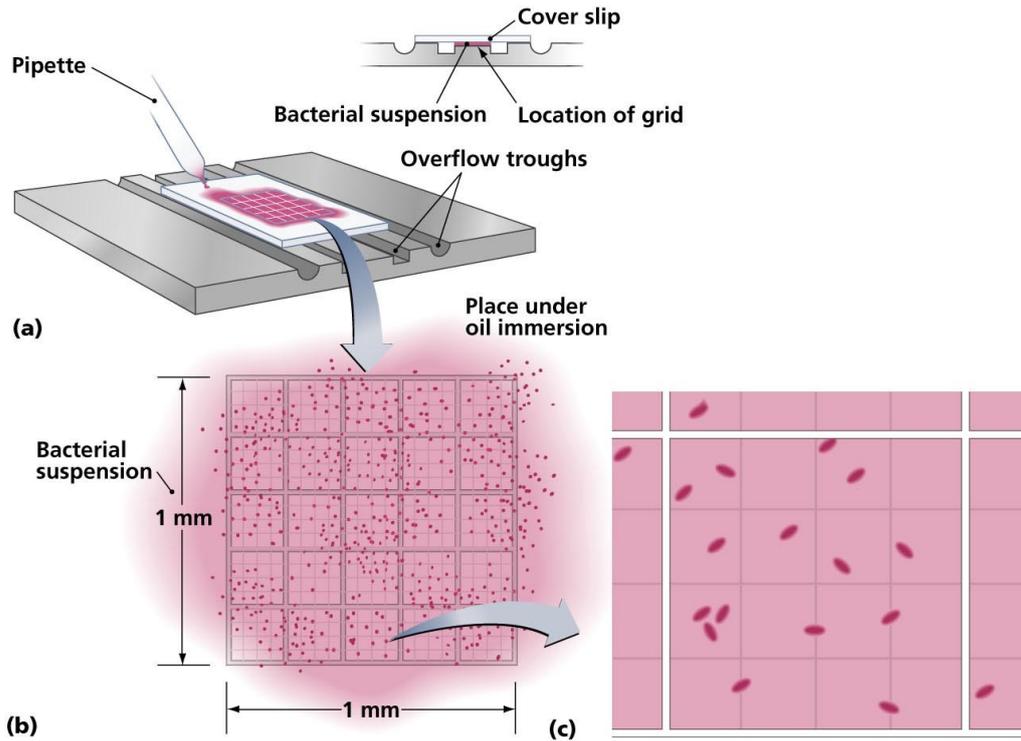
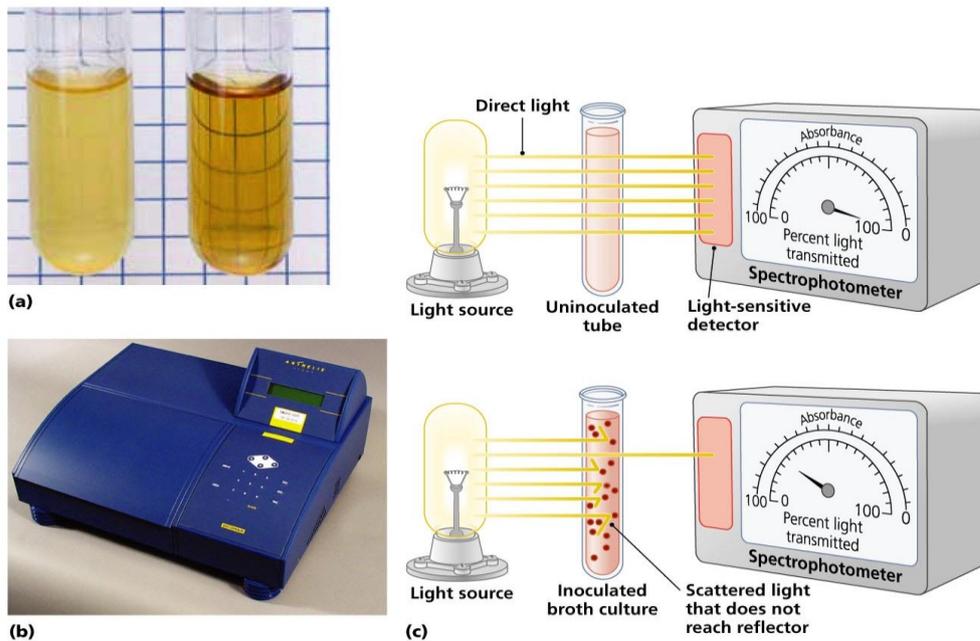


Fig. 14 - Cinética do consumo de acetonitrilo (por cromatografia de fase gasosa) durante o crescimento de *Geotrichum* sp. na presença de diferentes concentrações de acetonitrilo (● 2 M, △ 1,5 M, □ 1 M, ◇ 0,5 M).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 15 - Representação esquemática da contagem direta de células em câmara de contagem. A câmara consiste de uma lâmina escavada na sua zona central, formando um quadrado, com um desnivelamento de 0,1 mm e 1 mm de lado. O volume de suspensão celular que ocupa essa área é $0,1 \text{ mm}^3$. O número de células contadas nesse volume é convertível noutra (ex. nº células/mL).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 16 – A densidade óptica de uma suspensão celular, usando como referência um tubo de meio não inoculado (a), é lida num espectrofotómetro, a um comprimento de onda fixo (entre 490 e 600 nm) (b). A diferença de absorvância entre o tubo com suspensão celular e o tubo com meio estéril possibilita a determinação da densidade celular na suspensão.

Dióxido de carbono produção/utilização. O CO₂ produzido durante o processo de mineralização pode ser coletado por uma armadilha alcalina, composta por NaOH (ou outra base forte), na forma de bicarbonato. Este pode, então, ser quantificado por diversos métodos químicos, sendo o mais comum a titulação por solução ácida padronizada.

O uso de substratos marcados com o radioisótopo ¹⁴-C permite medições muito sensíveis de evolução de ¹⁴CO₂. Esta técnica é frequentemente usada para a avaliação de taxas de biodegradação de contaminantes orgânicos.

4.2.2 Métodos de atividade microbiana em amostras ambientais

A atividade microbiana facilmente se correlaciona com a biomassa celular, quando tratamos com culturas puras, no entanto em amostras ambientais, de comunidades microbianas complexas, o mesmo não acontece. Nestas amostras ambientais, a atividade microbiana é determinada mais frequentemente em termos de taxas respiratórias ou de síntese de macromoléculas celulares. Na tabela 2 resumem-se alguns testes de utilização comum para a quantificação da atividade microbiana em amostras ambientais.

Tabela 2 – Testes comuns para a quantificação de atividade microbiana em amostras ambientais

Teste	Base do teste
Medição de gases respiratórios	Medição de CO ₂ produzido ou O ₂ consumido na amostra. O fluxo respiratório indica a atividade metabólica global.
Respiração de substratos marcados com radioisótopos	O metabolismo do substrato radiomarcado é seguido medindo a evolução do CO ₂ marcado.
Microelétrodos	Sondas (com pontas < 20 μm diâmetro) inseridas na amostra; permitem seguir o processo em contínuo.
Incorporação de timidina radiomarcada no DNA celular	Os microrganismos obtêm precursores do DNA, como a timidina, a partir do ambiente. A taxa de incorporação da timidina marcada é medida.
Carga energética de adenilato (CEA)	O valor da CEA reflete o contínuo entre uma comunidade microbiana ativa (>0,8) e uma comunidade com elevada proporção de células mortas (<0,4).
Ensaio de desidrogenase	Medida da taxa das reações de oxidação-redução pela redução do sal de tetrazólio por microrganismos que respiram.
Hidrólise de diacetato de fluoresceína	Esta reação é levada a cabo por diversas enzimas incluindo as esterases, proteases e lipases.

Determinação de gases respiratórios (CO₂ e O₂). Como já descrito para as culturas puras, o CO₂ e o aceitador final de eletrões do processo respiratório podem ser determinados tanto em culturas de laboratório como em condições naturais, no “campo”. Em condições controladas, em laboratório, a amostra é incubada, num recipiente selado, geralmente designado por *microcosmos*, e o fluxo de CO₂ e/ou O₂ na atmosfera do recipiente pode ser determinado. Os trabalhos de campo podem ser feitos com recurso a uma câmara de campo que se coloca sobre área de p.ex. solo ou sedimento a estudar. Em qualquer dos casos, amostras das atmosferas são retiradas com seringas estanques, apropriadas, e a concentração de gases é determinada por cromatografia da fase gasosa.

A determinação de taxas respiratórias tem diversas aplicações em microbiologia ambiental. Entre estas, inclui-se a avaliação das condições (“saúde”) do solo, por determinação da taxa basal de atividade microbiana; indicadores de taxa de biodegradação de poluentes, como os hidrocarbonetos de petróleo em sítios contaminados; determinação de biomassa microbiana; Carência bioquímica de oxigénio (CBO) e estudo das comunidades mistas em biofilmes.

Incorporação de marcadores radioativos em macromoléculas celulares. O conteúdo proteico e de DNA celular podem ser usados como medida de biomassa, como já anteriormente referido. Em amostras ambientais a biomassa, especificamente bacteriana, pode ser medida com recurso à incorporação de marcadores radioativos nas macromoléculas celulares. Entre estes marcadores, incluem-se o nucleósido timidina marcada com trítio (³H) que é incorporado no DNA, ou o aminoácido leucina, marcado com ³H ou com ¹⁴C, que é incorporado nas proteínas.

ATP e carga energética de adenilato. O ATP encontra-se presente em todos os microrganismos e pode ser medido com elevado grau de certeza. Apesar de a sua concentração depender do estado fisiológico celular, considera-se ser bastante uniforme em relação ao carbono celular, para a maioria das bactérias, algas e protozoários. Contudo, quando as células morrem a concentração de ATP decresce rapidamente, pelo que a determinação da sua concentração pode ser usada para estimar a biomassa viva.

Uma medida de biomassa viva alternativa, e que é independente do estado metabólico dos microrganismos, é o “pool” total de adenilato (A_T):

$$A_T = ATP + ADP + AMP$$

De um modo mais completo, a abundância de ATP relativamente àquela das moléculas suas precursoras, ADP e AMP, fornece uma base bioquímica para avaliar o estado nutricional e fisiológico celular, através da carga energética de adenilato (CEA):

$$CEA = (ATP + \frac{1}{2} ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

Valores elevados de CEA (>0,8) indicam uma comunidade ativa. Valores intermédios (0,4 – 0,6) indicam células em estado estacionário e valores baixos (<0,4) indicam uma grande proporção da comunidade em fase de senescência.

A quantificação de ATP de amostras necessita de um processo de extração inicial, após o que os componentes celulares são concentrados num tampão. A concentração de ATP é, então, determinada pelo ensaio bioquímico luciferina-luciferase. AMP e ADP presentes na amostra seguidamente são convertidos a ATP, por reações enzimáticas, e quantificados.

Ensaio enzimáticos específicos. Muitos testes enzimáticos têm sido desenvolvidos para a deteção de atividades específicas de um determinado microrganismo ou atividades gerais da comunidade microbiana. A tabela 3 indica alguns dos testes enzimáticos mais utilizados. Os dois testes enzimáticos mais comumente utilizados para a deteção de atividade microbiana geral são os testes da desidrogenase e da esterase.

Tabela 3. Alguns ensaios enzimáticos para a deteção de atividades microbianas e respetivo substrato.

Enzima	Substrato
Desidrogenase	Trifeniltetrazólio
Fosfatase	Fosfato de p-nitrofenol
Protease	Gelatina
Amilase	Amido
Quitinase	Quitina
Celulase	Celulose, carboximetil celulose
nitrogenase	Acetileno
Nitrato-redutase	Nitrato

4.3 Métodos imunológicos

Vários métodos imunológicos básicos (ensaios imunológicos) são correntemente utilizados em microbiologia ambiental. Ensaios imunológicos são métodos analíticos usados para a deteção e/ou quantificação de interações antígeno-anticorpo. Para a maioria dos diversos tipos de ensaios imunológicos a ligação da “molécula-sinal” ao anticorpo e/ou antígeno é de grande importância. Entre as moléculas sinal utilizadas nos ensaios imunológicos incluem-se a iodina, enzimas, fluorocromos e radioisótopos.

Anticorpos (Ac), também conhecidos por **imunoglobulinas (Ig)** ou **gamaglobulinas**, são proteínas complexas produzidas pelo sistema imunitário de vertebrados (sintetizadas por células derivadas dos *linfócitos B*), com a função de identificar e neutralizar objetos estranhos ao corpo, tais como bactérias, vírus, pólen, etc.

A estrutura geral dos anticorpos é semelhante, com a exceção de uma pequena zona, nas suas extremidades que é extremamente variável e que é a responsável pelo reconhecimento e ligação aos antígenos (parte da molécula ou estrutura estranha ao corpo, e que a permite reconhecer como tal). A molécula de anticorpo é, estruturalmente, constituída por quatro cadeias proteicas – *duas cadeias pesadas* e *duas cadeias leves* – que se ligam por pontes dissulfídicas para formar uma estrutura em forma de Y (Fig. 17). A região constante do anticorpo determina a sua classe: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD (Tabela 4).

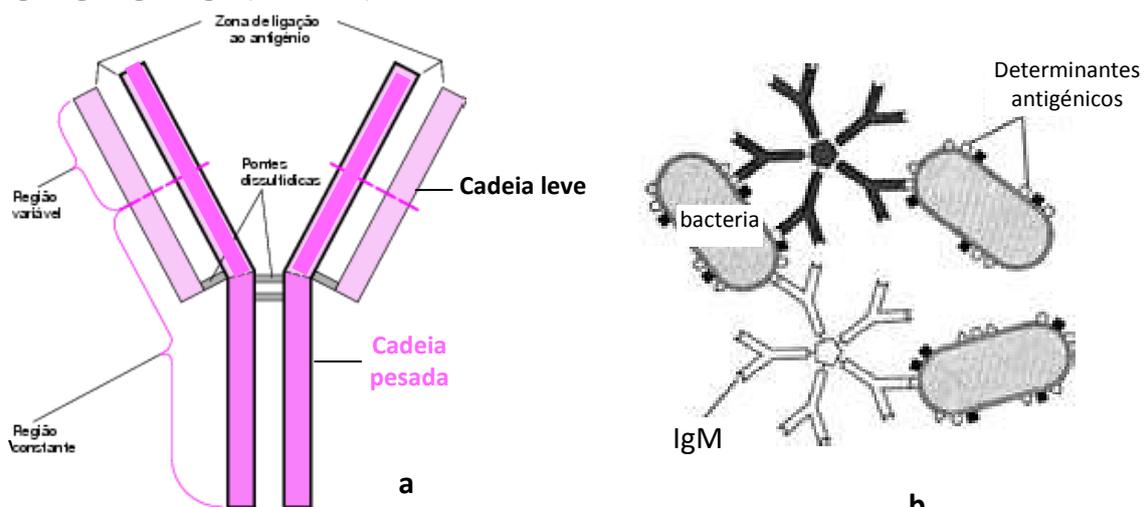
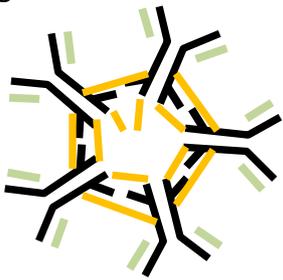


Fig. 17 – (a) Representação esquemática de molécula de antígeno; ↯ cadeias pesadas dobram-se na região que se liga à cadeia leve. (b) Reação entre um anticorpo (IgM) e os determinantes antigénicos na molécula de antígeno (neste caso são moléculas na superfície de uma bactéria); os anticorpos reconhecem apenas regiões específicas na molécula do antígeno.

Tabela 4 – Classes de anticorpos conhecidos

Imunoglobulina	Descrição
IgG 	<p>O tipo de anticorpo mais frequente (cerca de 80% do total de Ac no soro normal), só se produz depois de várias exposições a um antigénio. Por exemplo, depois de receber uma segunda dose de vacina antitetânica (de reforço), uma criança produz anticorpos IgG num lapso de tempo de 5 a 7 dias. Esta resposta secundária de anticorpos é mais rápida e abundante do que a resposta primária. A IgG encontra-se tanto no sangue como nos tecidos. É o único anticorpo que se transmite da mãe para o feto através da placenta. A IgG da mãe protege o feto e o recém-nascido até que o sistema imunitário do bebé possa produzir os seus próprios anticorpos.</p>
IgA 	<p>Anticorpo que desempenha um papel importante na defesa do corpo quando se verifica uma invasão de microrganismos através de uma membrana mucosa (superfícies revestidas, como o nariz, os olhos, os pulmões e os intestinos). A IgA encontra-se no sangue (cerca de 10% do total de Ac do soro) e em algumas secreções como as do tubo gastrointestinal e do nariz, dos olhos, dos pulmões e do leite materno.</p>
IgE 	<p>Anticorpo que produz reações alérgicas agudas (imediatas). Neste aspeto, é o único tipo de anticorpo que aparentemente faz mais mal que bem. Contudo, pode ser importante no momento de combater infeções parasitárias, muito frequentes nos países em vias de desenvolvimento.</p>
IgD 	<p>Anticorpo presente em concentrações muito pequenas no sangue que circula pelo corpo. Função ainda não bem compreendida.</p>
IgM 	<p>A imunoglobulina M é o anticorpo que é produzido face à primeira exposição a um antigénio. Por exemplo, quando uma criança recebe a primeira vacina antitetânica, os anticorpos antitetano formam-se 10 a 14 dias mais tarde (resposta primária de anticorpos). A IgM abunda no sangue (cerca de 5 a 10% dos anticorpos do soro normal), mas normalmente não está presente nos órgãos nem nos tecidos.</p>

Seguidamente faz-se um resumo de alguns dos ensaios imunológicos mais comuns.

Imunofluorescência (imunomarcção fluorescente). Técnica que consiste no uso de moléculas-sinal conjugadas com anticorpos para interagir com um determinado antígeno, e subsequentemente indicar a sua presença, pela produção de uma luz fluorescente. Em termos práticos, a amostra a estudar é adsorvida a uma lâmina de microscópio após o que se adiciona um anticorpo fluorescente conjugado, específico para determinado antígeno. Se o antígeno está presente na amostra, ligar-se-á ao anticorpo adicionado. A lâmina é seguidamente observada a um microscópio equipado com luz fluorescente e os antígenos (marcados com o anticorpo fluorescente) aparecem verdes fluorescentes num fundo preto. Este ensaio é usado, por exemplo, para a deteção de protozoários parasitas *Giardia* e *Cryptosporidium*, em amostras de água, ou para o estudo de culturas mistas.

Técnica ELISA (o inglês *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*). Os antígenos ou anticorpos são adsorvidos a uma superfície sólida e subsequentemente combinados com o material de teste para deteção do antígeno. Dependendo do tipo de anticorpo e de antígeno pode aplicar-se um processo de ELISA direto ou ELISA indireto. Ambos as técnicas são feitas com recurso a microplacas (Fig. 18). No processo ELISA direto, um *anticorpo primário* (i.e. o primeiro anticorpo a ser usado) é adsorvido à superfície de um poço de microplaca. Seguidamente adiciona-se uma amostra com antígeno que se liga ao anticorpo primário ficando deste modo “fixas” no poço da microplaca. Numa segunda fase adiciona-se um anticorpo secundário (i.e. o segundo anticorpo a ser usado) conjugado com uma enzima (molécula-sinal) que se liga ao antígeno, já ligado ao anticorpo primário. Entre cada adição os poços são lavados para retirar o excesso de antígeno e de anticorpos. Seguidamente adiciona-se o substrato específico da enzima e é produzida uma substância corada, cuja concentração é proporcional à quantidade de antígeno na amostra, e permitindo assim quantificá-lo.

Animação: ELISA <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>).

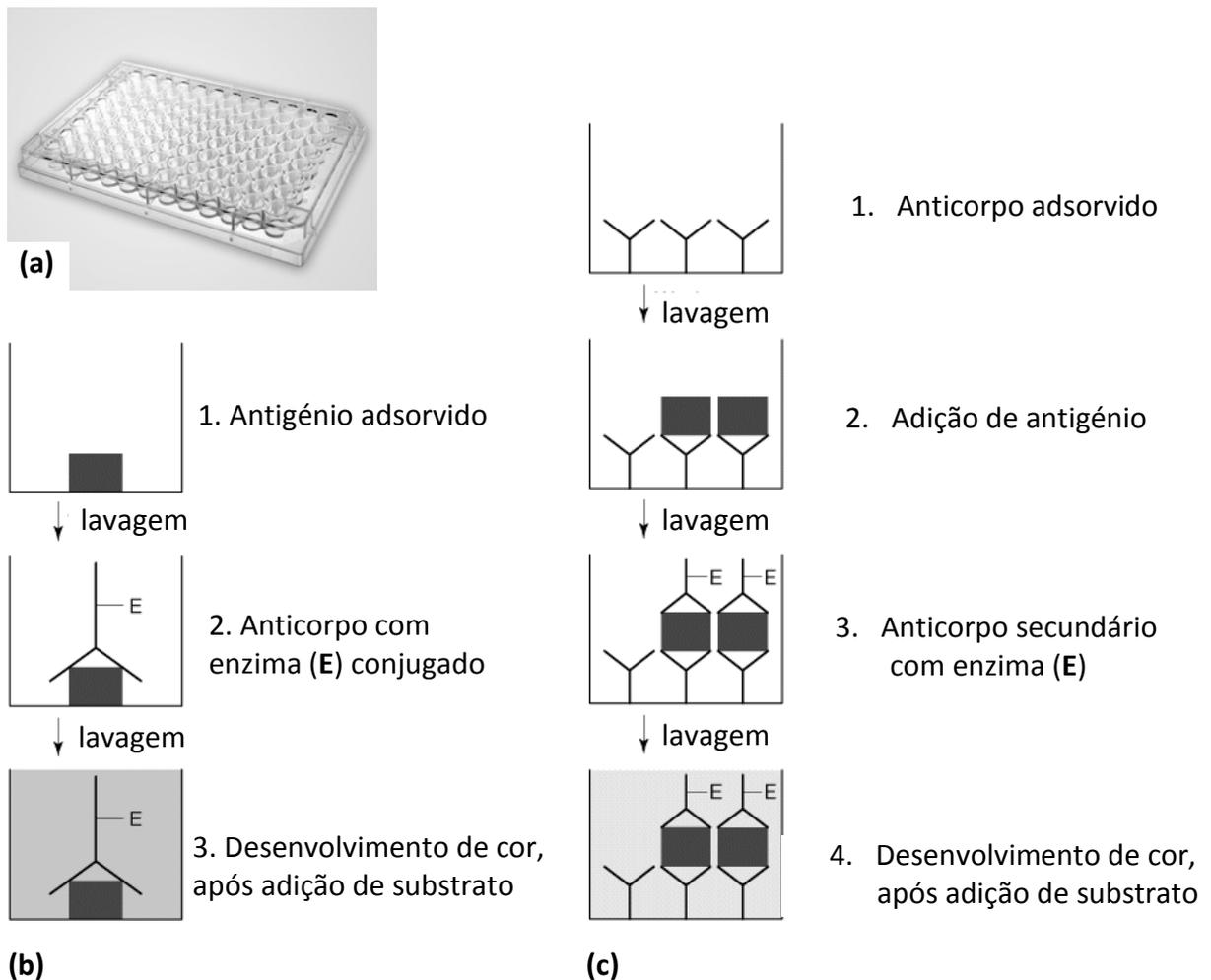
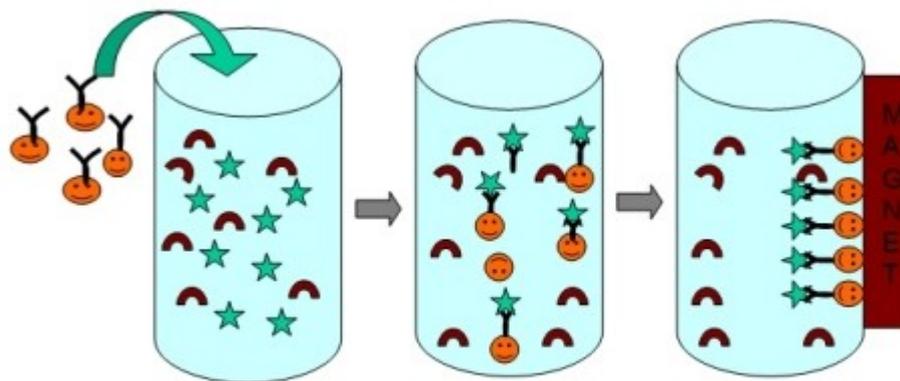


Fig. 18 – A técnica de ELISA é geralmente desenvolvida em microplacas (a) e pode apresentar diversas variantes das quais são apresentadas esquematicamente (b) a técnica de ELISA direta e (c) a técnica de ELISA indireta.

Técnica de separação imunomagnética. Esta técnica usa anticorpos conjugados com esferas paramagnéticas para capturar, concentrar e purificar (Fig. 19). Os anticorpos revestidos de esferas magnéticas (com um diâmetro de 100 nm – 20µm) ligam-se ao antígeno em solução e são seguidamente separados da solução usando um magnete. Um exemplo da sua utilização é a recuperação de bactéria redutora de sulfato *Thermodesulphobacterium mobile* da água de depósitos de óleo localizadas por baixo das plataformas petrolíferas.



Adição de anticorpos revestidos de esferas magnéticas à amostra de água.

Agitação de modo a que os microrganismos-alvo (contendo o antígeno) sejam capturados pelas esferas

Recolha dos complexos microrganismo-anticorpo-esfera magnética pelo uso de um ímã externo forte.

Fig. 19. Representação esquemática da técnica de separação imunomagnética (de http://oh.water.usgs.gov/micro2/images/ims_figure.jpg).

4.4 Métodos moleculares baseados em ácidos nucleicos

Os métodos baseados na deteção de conteúdo de ácidos nucleicos de uma comunidade microbiana permitem obter uma imagem bastante completa da biodiversidade presente nessas comunidades microbianas, ao contrário dos métodos de cultura tradicionais em que apenas uma parte dos microrganismos é detetada (entre 1 a 10% da diversidade microbiana). É uma abordagem que geralmente implica a separação das células de microrganismos presentes na comunidade (por filtração, centrifugação, etc.), a sua lise celular (quimicamente ou por ação enzimática), e extração e purificação do seu DNA. O DNA dos diferentes microrganismos é então detetado por diversos métodos, sendo os mais comuns resumidos em seguida. Os métodos moleculares baseados em ácidos nucleicos dão uma informação qualitativa sobre a diversidade de microrganismos presentes nas amostras (cada cadeia distinta de DNA representa um microrganismo diferente), mas não permite obter uma informação quantitativa (com indicação da abundância de cada espécie ou estirpe).

Reação em cadeia pela polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*, PCR). A reação em cadeia pela polimerase, mais conhecida pela sigla PCR é um método de *amplificação* (criação de múltiplas cópias) de DNA. É um método que se baseia no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*, catalisado pela enzima *DNA polimerase* e fazendo uso de oligonucleótidos iniciadores (*primers*, constituídos por sequências de 15 a 30 nucleótidos em cadeia simples) (Fig. 20).

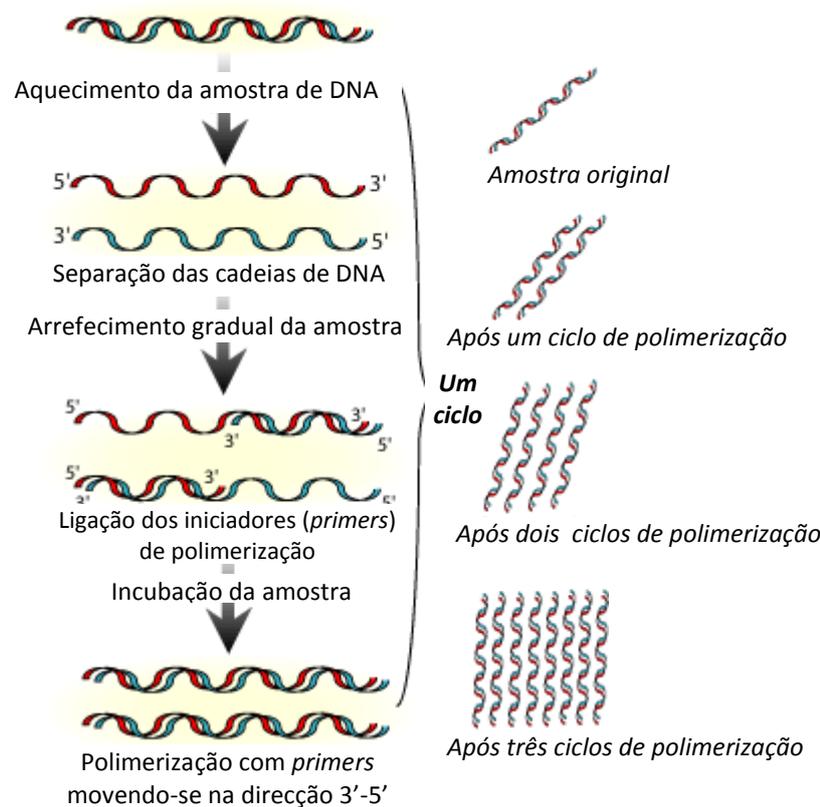


Fig. 20 – A reação em cadeia da polimerase é usada para obter milhões de cadeias de DNA, num curto espaço de tempo. (de <http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/>).

No método de PCR a molécula de DNA é desnaturada por aumento de temperatura, e as duas cadeias simples resultantes ligam-se aos *primers* (são necessários dois *primers* complementares das sequências que ladeiam o fragmento de DNA a amplificar). Deste modo, a enzima DNA polimerase pode ligar-se a cada uma das cadeias simples de DNA (usadas como molde para a síntese do novo fragmento de DNA) e sintetizar a respetiva cadeia complementar. As DNA polimerases utilizadas são enzimas termoestáveis, que foram originalmente isoladas da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA

polimerase) que atua a temperaturas elevadas, assim possibilitando o seu uso nas condições necessárias à técnica do PCR. A técnica do PCR é atualmente considerada uma das técnicas fundamentais em bioquímica e biologia molecular e presenteou o bioquímico *Kary Mullis*, que a desenvolveu, com o prémio Nobel da Química em 1993 (Mullis, 1990).

Animação: PCR (língua inglesa) https://youtu.be/eEcy9k_KsDI

Análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP*). A técnica de RFLP baseia-se na hidrólise do DNA com *enzimas de restrição* (enzimas que cortam a molécula de DNA, no seu interior, em locais bem definidos, específicos de cada uma) e na posterior separação, por eletroforese, dos fragmentos resultantes, os quais originam *padrões de restrição* específicos. Estes padrões podem ser característicos ao nível da espécie ou de estirpe.

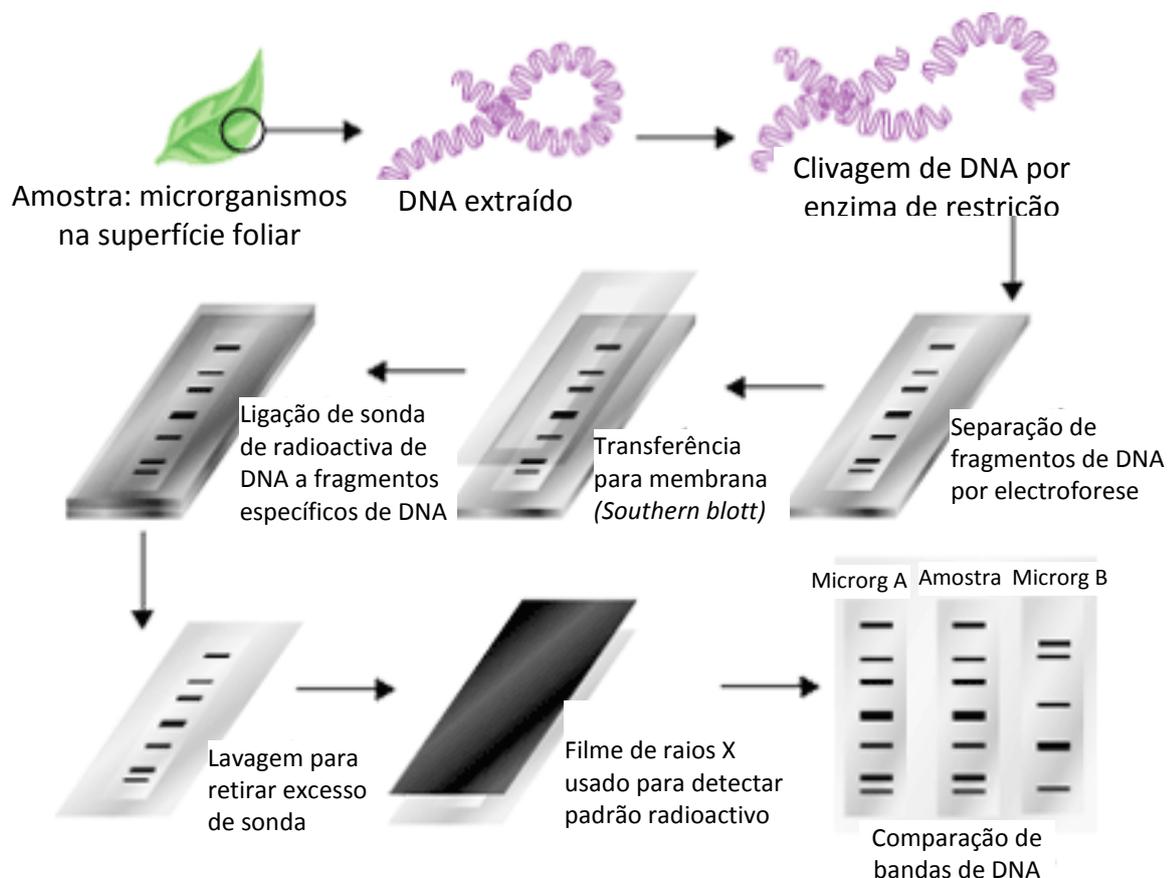


Fig. 21 – Esquema da técnica de análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) (de <http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/>).

Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês *Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE*)/ **Eletroforese em gel de gradiente de temperatura** (do inglês *Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE*).

DGGE e TGGE são dois tipos de eletroforese que se baseiam, respetivamente, na formação de um gradiente químico ou gradiente de temperatura, ao longo do gel de eletroforese, e que leva à desnaturação dos fragmentos de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) presentes na amostra. A eletroforese de ácidos nucleicos (assim como a de proteínas) baseia-se no fato de estes terem carga negativa e de, assim, ao lhes ser aplicado um campo elétrico, as moléculas de DNA se deslocarem do pólo negativo para o pólo positivo, de acordo com o respetivo peso molecular (*i.e.* quanto maior for a molécula menor a sua taxa de deslocação). Quando adicionalmente colocamos uma molécula de DNA num gradiente químico desnaturante (ex. ureia, com concentração entre 0 e 100%), ou de temperatura, as moléculas deslocar-se-ão, inicialmente em função do seu peso, mas quando a concentração do agente desnaturante, ou o efeito da temperatura, causar a separação das suas cadeias complementares, a sua deslocação desacelera e pára (Fig. 22).

Em qualquer das técnicas, a desnaturação do DNA (separação das duas cadeias complementares da molécula de DNA) depende da composição química do fragmento de DNA, em termos de bases constituintes (a proporção relativa de A=T e G≡C no fragmento de DNA implica na força de ligação existente entre as duas cadeias complementares).

Estas técnicas são sensíveis a pequenas diferenças na composição dos fragmentos de ácidos nucleicos e são frequentemente utilizadas em estudos da biodiversidade de comunidades microbianas.

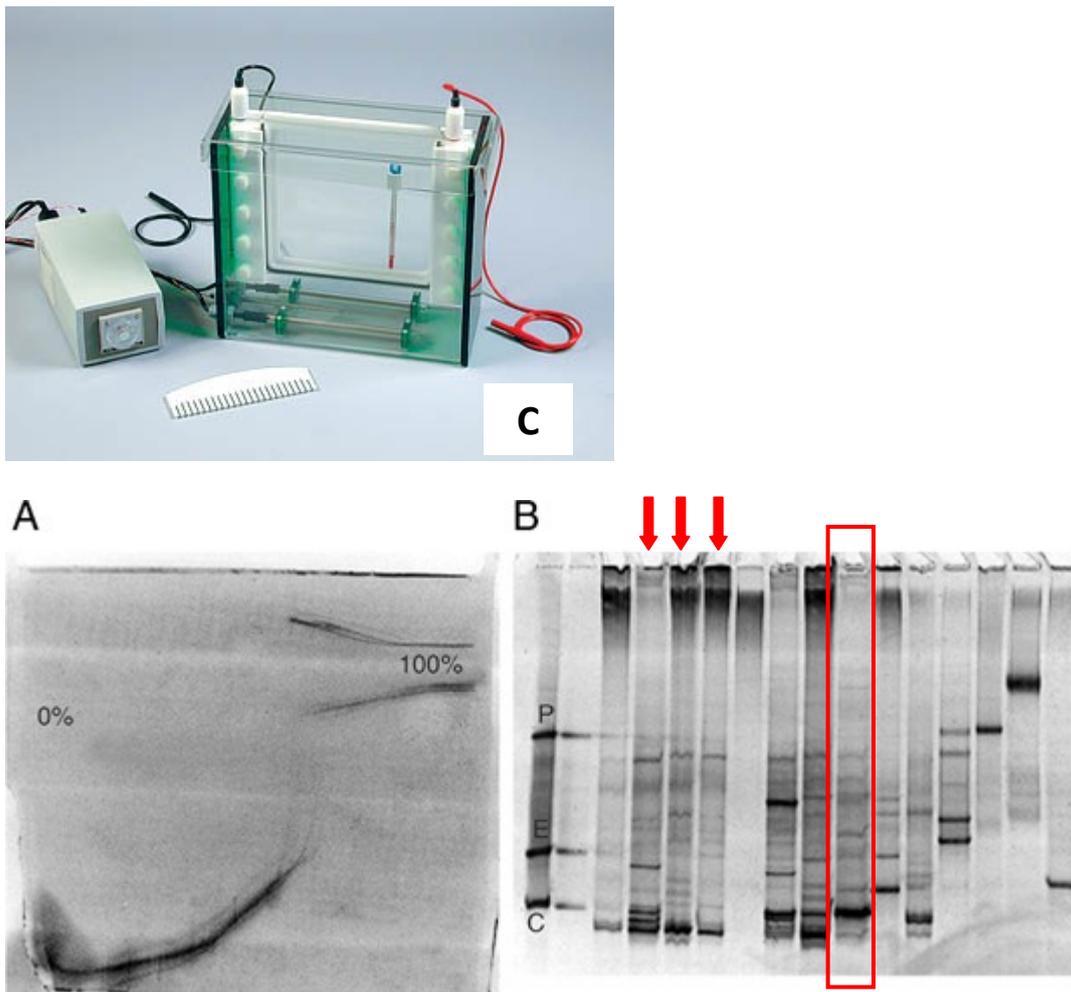


Fig. 22 – Na técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante(DGGE) usa-se um equipamento de eletroforese (**C**). Numa primeira fase é necessário escolher o intervalo do gradiente de concentração do agente desnaturante (gel **A**). Numa segunda fase, adicionam-se amostras nos poços do gel(indicado com setas vermelhas em **B**), preparado com o gradiente desnaturante (de acordo com a fase 1), após o que é aplicado o campo elétrico. A separação dos diferentes fragmentos de molécula de DNA separam-se formando uma série de bandas (retângulo a vermelho). Cada banda de DNA corresponde a um microrganismos diferente.

Animação: Como se processa o DGGE? (língua inglesa):

<https://youtu.be/VWAMz6WLwM0>

Animação: Eletroforese (língua inglesa):

<https://youtu.be/RNQR7y58QAo>

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

ATLAS, R.M. e BARTHA, R. 1993. *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*, 3rd Ed., The Benjamin / Cummings Pub Co., Inc.

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C. (www.standardmethods.org)

Madigan, M.T., Martinko, J.M. e Parker, J. 2004. *Microbiologia de Brock* 10 edição, Prentice Hall.

Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262** (4): 56–61, 64–5. [doi:10.1038/scientificamerican0490-56](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56). [2315679](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56).

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. [Appl Environ Microbiol. 59:695-700](https://doi.org/10.1093/aem/59.4.695).