

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
Bacharelado em Gestão Ambiental
Componente curricular: Microbiologia Ambiental
Aula 12

Professor Antônio Ruas

- 1. Créditos: 60**
- 2. Carga horária semanal: 4**
- 3. Semestre: 2°**
- 4. *Testes bacterianos***

- Importância da enumeração de coliformes em alimentos
 - Microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias: são grupos de organismos que quando presentes em um alimento fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos.

Características de um bom indicador de contaminação fecal

- Rápida e fácil detecção
- Não deve estar presente como contaminante natural do alimento
- Habitat exclusivo:trato intestinal
- Ocorrer em números altos nas fezes

- Características de um bom indicador de contaminação fecal
- Em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes indica:
 - Processamento térmico inadequado e/ou recontaminação pós processamento
 - Proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de mos patogênicos

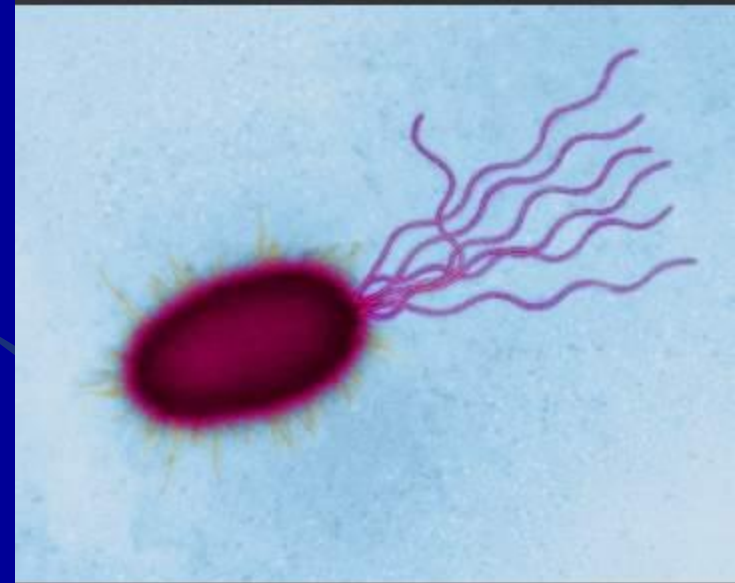
- Características de um bom indicador de contaminação fecal
- *E. coli* como indicador: habitat: trato intestinal de animais;
- COLIFORMES TOTAIS OU GRUPO COLIFORME:
- Família Enterobacteriaceae
- Bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 35-37°C/24-48h
- Existem os fermentadores tardios de lactose!!!!
- Gêneros:
 - *Escherichia* (só a *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal). *E. coli* é um bom indicador: habitat: trato intestinal de animais;
 - *Enterobacter*
 - *Citrobacter*
 - *Klebsiella*



- COLIFORMES FECAIS (termotolerantes)
- → Os coliformes termotolerantes fazem parte do grupo coliformes totais.
- Característica: continuam fermentando a lactose com produção de ácido e gás quando incubados a $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ /24-48h;
- 90% das culturas de *E. coli* são positivas;
- Apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* apresentam esta característica;
- *E. coli* (vários sorotipos)

- Aspectos da *Escherichia coli*

- **CLASSIFICAÇÃO**



- ENTEROPATOGÊNICA CLÁSSICA (EPEC)
- ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)
- ENTEROINVASORA (EIEC)
- ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)
- FACULTATIVAMENTE ENTEROPATOGÊNICA (FEEC)
- ENTEROAGREGATIVA (EA_{gg}EC)

• Enterites por *E. coli* - EPEC

- EPEC ("Enteropathogenic *E.coli*" ; *E.coli* Enteropatogênica) é uma doença diarréica, do tipo não sanguinolento epidêmicas em crianças, especialmente em países pobres.
- Gastroenterite em crianças
- Dores abdominais, vômito e febre
- Duração 6h a 3 dias
- Capacidade de adesão a mucosa intestinal- destruição das vilosidades intestinais

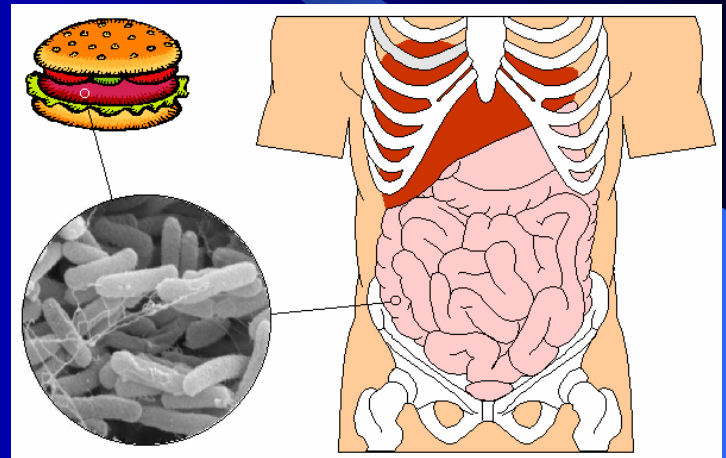
- **Enfermidade transmitida por alimentos - EIEC**
- EIEC ("Enteroinvasive *E.coli*" ; *E.coli* Enteroinvasiva): são invasivas e destrutivas da mucosa intestinal, causando úlceras e inflamação. O resultado é diarreia aquosa inicial seguida de diarreia com sangue e muco, semelhante à da disenteria bacteriana, em 8 – 44 horas.

• Enfermidade transmitida por alimentos - ETEC

- Capazes de produzir enterotoxinas
- Diarréia aquosa, febre baixa, dores abdominais, náuseas
- Forma mais severa: semelhante a cólera: fezes tipo água de arroz –desidratação
- PI: 8-44h

• Enfermidade transmitida por alimentos EHEC

- Gado reservatório natural
- Sintomas:
- *E. coli*: O157:H7 – “doença do hamburguer”
- Produção de citotoxinas
- Colite hemorrágica: dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, sem febre
- PI: 3-9 dias
- Pode evoluir para síndrome urêmica hemolítica (grave)



ESCHERICHIA COLI

ENTEROHEMORRÁGICA

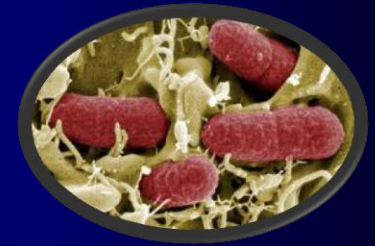
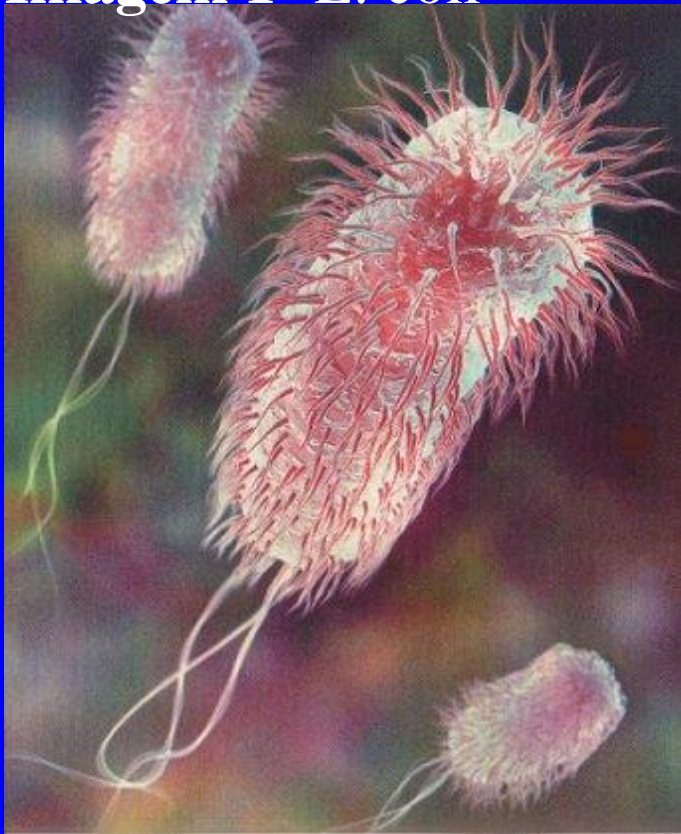


Imagem 1- E. coli



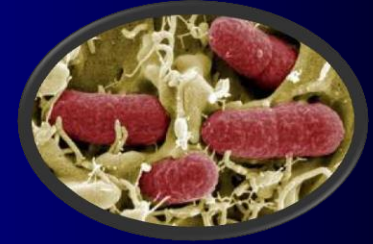
Fonte: MD.SAÚDE

**Imagem 2- E. coli sob
microscópio**



Fonte: Udonmap

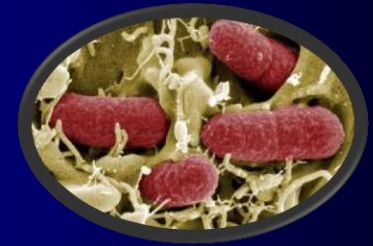
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



Nomes populares:

- Diarreia sanguinolenta;
- Colite hemorrágica.

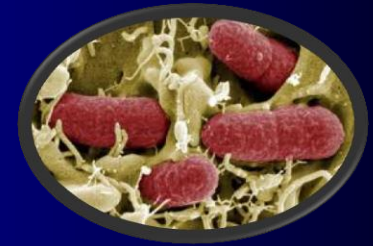
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



Agente causador:

- Bacilo Gram-negativo - Família Enterobacteriaceae - *Escherichia coli* produtora de verotoxinas (VT1 e VT2) ou toxina de Shiga (STX1 e STX2) também conhecidas como VTEC ou STEC. A cepa tipo é a *E. coli* 0157:H7. Mais de 400 sorotipos diferentes de *E. coli* produzem verotoxina.

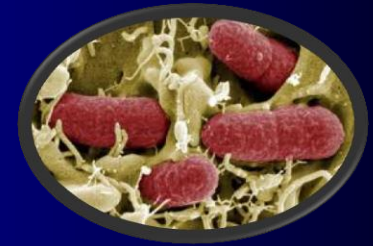
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



- **Espécies acometidas:**
- Ruminantes: bovinos, ovinos, caprinos.



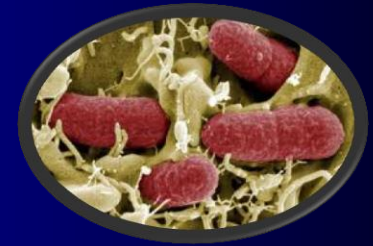
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



Sintomas nos seres humanos:

- Diarreia;
- Diarreia sanguinolenta;
- Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU);
- Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT).

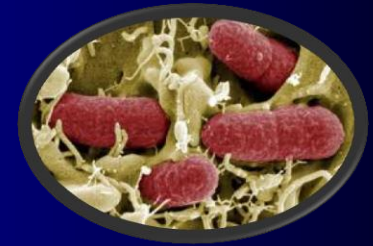
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



Formas de transmissão:

- **Humanos:** Ingestão de água e alimentos contaminados por fezes de animais infectados.
- **Animais:** Geralmente ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes de animais doentes ou de portadores.

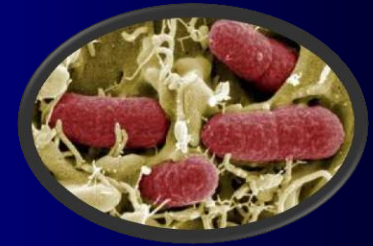
ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



Diagnóstico:

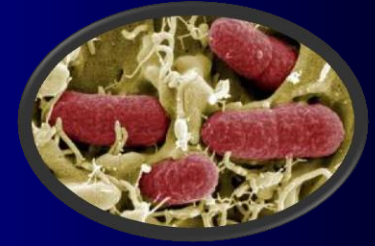
- **Humanos:** Isolamento da *E. coli* O157:H7 ou pela detecção de verotoxinas livres em fezes diarreicas e nos alimentos suspeitos.
- **Animais:** Isolamento da *E. coli* O157:H7 nas fezes.

ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA



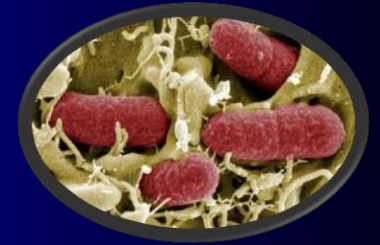
Notificação Obrigatória:

- Sim.



Histórico

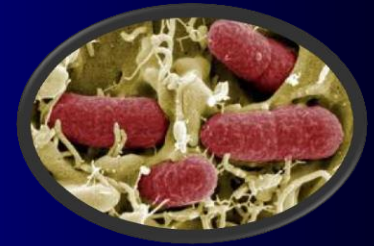
- A partir da década de 1980, inúmeros surtos e casos esporádicos de infecções por O157:H7 foram descritos na América do Norte, Europa, África, Ásia e América Latina.



Ciclo Epidemiológico

- Cepas VTEC sobrevivem, por meses, nas fezes, no solo e na água contaminados com matéria fecal.
- A *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em condições de baixo pH como nos sucos e nas carnes fermentadas. As verduras podem ser contaminadas durante o cultivo através da irrigação com água contaminada.
- Ruminantes saudáveis, incluindo bovinos, ovinos, veados e cabras, carregam cepas VTEC

Evolução da Doença

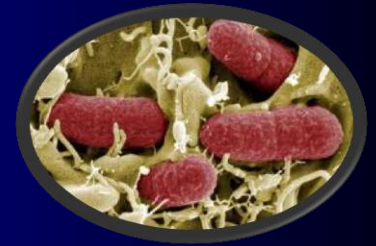


- período de incubação varia de três a oito dias, com um período mediano de três a quatro dias. Após esse período, os pacientes apresentam dores abdominais e diarreia não sanguinolenta, progredindo na maioria dos *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA O157:H7 72 casos para diarreia sanguinolenta, após dois a três dias.

Formas de Transmissão

- através de alimentos de origem bovina, tendo sido a carne moída, crua ou mal passada!

Prevenção e Controle



- A detecção do patógeno *E. coli* O157:H7 deve ser notificada, assim como o material de laboratório deverá ser encaminhado para o Instituto Adolfo Lutz para outros testes de *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA O157:H7 74 confirmação ou subtipagem (*Pulsed-field*). Os óbitos por doença diarreica aguda devem ser imediatamente notificados à vigilância epidemiológica. As notificações devem ser feitas às equipes de vigilância regional, Municipal, ou então, à Central de Vigilância Epidemiológica.

- TESTES DA COLIMETRIA

- Dividido em:

- PRESUNTIVO

- CONFIRMATIVO

- COMPLETO

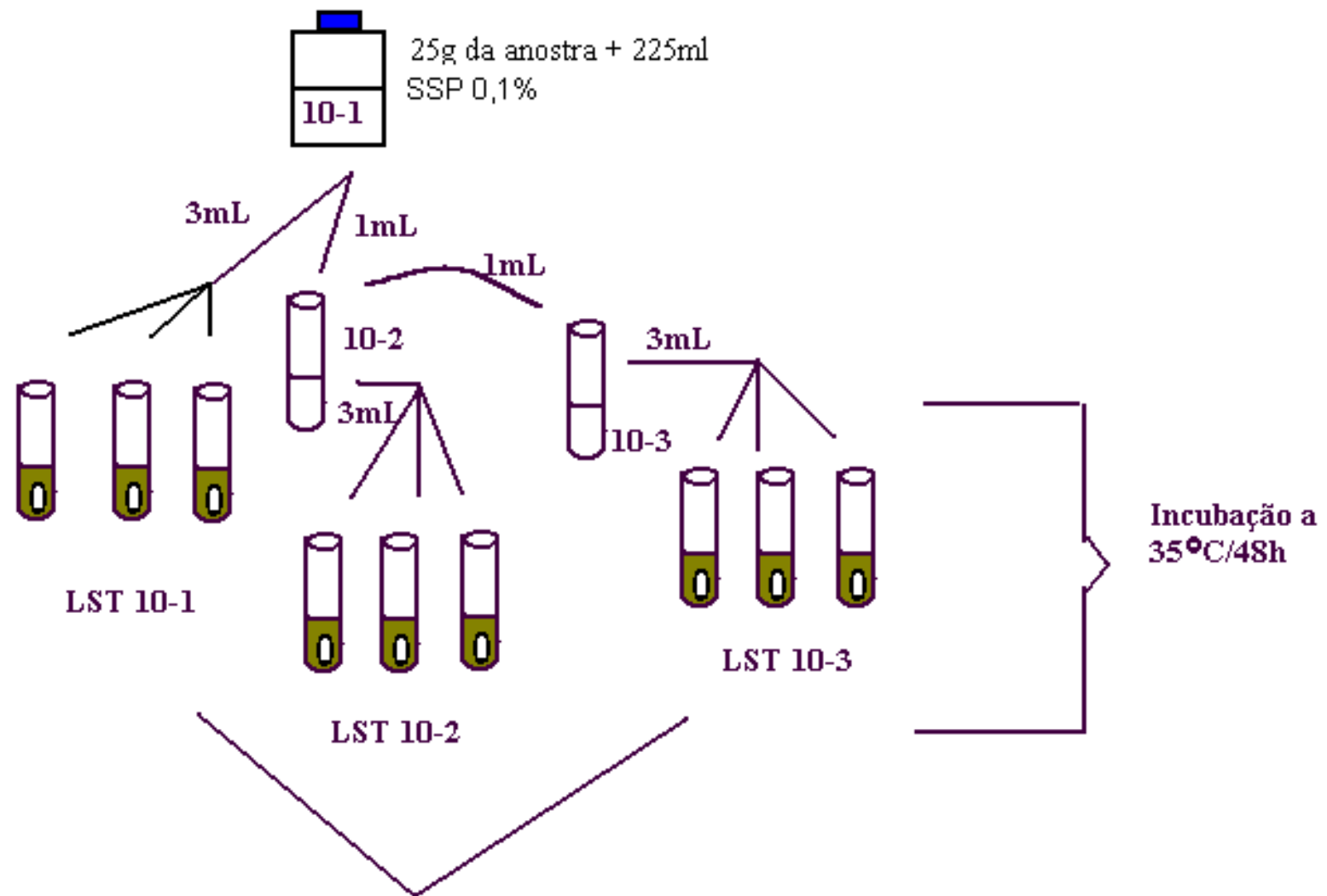
- Teste presuntivo
- Este teste é realizado tanto para coliforme total como para coliforme fecal.
- Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos
- Três séries de três tubos
- Incubação :35-37°C por 24-48 h.
- Leitura: Os coliformes utilizam a lactose produzindo ácido e gás, sendo este detectado no teste presuntivo através da retenção de gás no tubo de Durham.

Execução do teste

Teste presuntivo

- a) tomar uma bateria contendo 15 tubos de ensaio distribuídos de 5 em 5;
- b) nos primeiros 5 tubos, (os que contêm caldo lactosado de concentração dupla) inocular com pipeta esterilizada, 10 ml da amostra de água a ser examinada, em cada tubo. (Diluição 1:1);
- c) nos 10 tubos restantes (os que contêm caldo lactosado de concentração simples), inocular nos 5 primeiros, 1 ml da amostra (Diluição 1:10) e nos 5 últimos tubos, inocular 0,1 ml da amostra, em cada tubo. (Diluição 1:100). Ver página 15;
- d) misturar;
- e) incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}$ C durante 24/48 horas;
- f) se no final de 24/48 horas, houver a formação de gás dentro do tubo de Durham, significa que o teste Presuntivo foi Positivo. Neste caso, fazer o teste confirmativo. Se não houver a formação de gás durante o período de incubação, o exame termina nesta fase e o resultado do teste é considerado negativo.

Observação: No lugar do caldo Lactosado pode ser usado o caldo Lauril Tryptose.



- **Teste confirmativo para Coliforme Total**
- Os tubos positivos no teste presuntivo são semeados em Caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL) com tubos de Durham em seu interior
- Incubação: 35-37°C por 24-48 h.
- Leitura: os tubos com produção de gás = positivos no teste confirmativo.
- Cálculo do Número Mais Provável (NMP) para Coliformes Totais.

Teste confirmativo

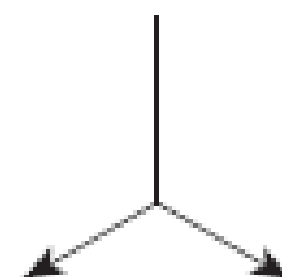
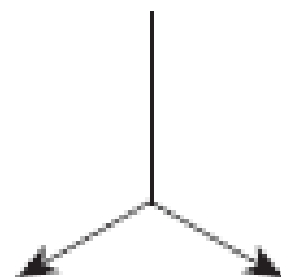
- a) tomar o número de tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) nas 3 diluições 1:1; 1:10 e 1:100;
- b) tomar igual número de tubos contendo o meio de Cultura Verde Brilhante Bile a 2%;
- c) com a alça de platina, previamente flambada e fria, retirar de cada tubo positivo uma porção de amostra e inocular no tubo correspondente contendo o meio Verde Brilhante. Este procedimento chama-se repicagem;
- d) identificar os tubos;
- e) incubar durante 24/48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- f) se no final do período de 24/48 horas houver a formação de gás dentro do tubo de Durham o teste é considerado Positivo. Caso não haja formação de gás, o teste é considerado negativo.

Fases do teste

Inocular em Cl ou CLT e
incubar por 24 ± 2 hs a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

(A) Formação de gás ou
crescimento forte.
Confirmar em VB a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
durante 24/48 horas

(B) Ausência de gás ou
produção duvidosa. Incubar
por + 24 horas



1) Não produz gás.
Ausência do grupo
coliforme

2) Produz gás.
Grupo coliforme
confirmado.

1) Produção de gás ou
produção duvidosa e
crescimento forte.
Confirmar como em (A)

2) Ausência de gás.
teste negativo para o
grupo coliforme

Nota: CL = Caldo lactosado
CLT = Caldo lauril triptose
VB = Verde brilhante bile a 2%

Expressão dos resultados

- a) os resultados são expressos em N.M.P (Número Mais Provável) /100 ml de amostra.
- b) para se determinar o N.M.P, verifica-se a combinação formada pelo número de tubos positivos que apresentaram as diluições 1:1; 1:10 e 1:100 no Teste Confirmativo.

Exemplo:

- a) nos 5 tubos da diluição 1:1, obtiveram-se 3 tubos positivos;
- b) nos 5 tubos da diluição 1:10, obtiveram-se 2 tubos positivos;
- c) nos 5 tubos da diluição 1:100, obteve-se 1 tubo positivo;
- d) formou-se, portanto, a combinação 3-2-1;
- d) determina-se o N.M.P consultando a tabela 1.

Se não quiser trabalhar com 15 tubos para determinar o NMP fazer apenas 5 tubos na diluição 1:1 (10 ml do meio de cultura + 10 ml da amostra) e calcular o NMP consultando a tabela 2.

Tabela 1 – do NMP com limite de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml)

Combinação de positivos	NMP/100 ml	Limites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	17
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	26	12	67
4-2-0	22	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690

Combinação de positivos	NMP/100 ml	Limites	
		Inferior	Superior
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	≥1600	-	-

Fonte: APHA, 1985

Coliformes termotolerantes

Método dos tubos múltiplos

Material necessário:

- a) tubos de ensaio com Meio EC;
- b) bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- c) alça de platina;
- d) banho-maria.

Execução do ensaio

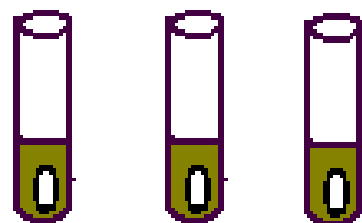
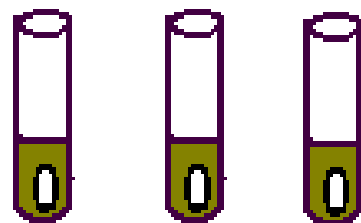
- a) tomar todos os tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) e todos os tubos negativos em que houve crescimento após 48 horas, nas 3 diluições (1:1; 1:10 e 1:100);
- b) transferir, com alça de platina flambada e fria, uma porção para os tubos de ensaio contendo o meio EC;
- c) misturar e deixar todos os tubos em banho de água durante 30 minutos;
- d) incubar em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ durante 24 ± 2 horas;
- e) se no final de 24 horas ou menos houver a formação de gás, está indicado a presença de coliformes de origem fecal;
- f) calcular o N.M.P consultando a tabela 1.

Nota: Este ensaio deve ser realizado simultaneamente com o Teste Confirmativo para Coliformes Totais.

Observação: Fazer sempre este exame toda vez que forem realizados testes confirmativo para coliformes totais.

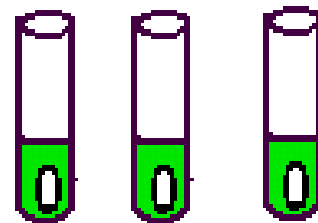
Tubos LST positivos:

Exemplo
diluição 10-1
3 tubos positivos



**Caldo
EC**

44,5 °C./24-48h



Caldo VBBL

35-37 °C/24-48h



**Cálculo
NMP**

10-1



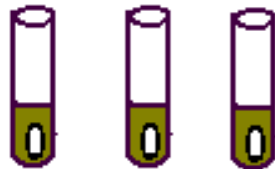
- Teste confirmativo para Coliforme Fecal (coliformes termotolerantes)
- Tubos positivos no teste presuntivo - Caldo *Escherichia coli* (EC) contendo tubos de Durham em seu interior.
- Incubação: $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h.
- Leitura: os tubos com produção de gás = + para o teste confirmativo.
- Cálculo do Número Mais Provável (NMP) para Coliformes a 45°C .

- **Teste em placa para coliformes termotolerantes e *E. coli*.**
- Os tubos positivos no teste confirmativo (VBBL) foram semeados para o meio EMB (Eosina Metileno Blue) - possui sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram (+), favorecendo o crescimento das Gram (-).
- A placa foi dividida de acordo com o número de diluições positivas no VBBL;
- Semeadura por estriamento do inoculo no meio de cultura.
- incubação foi a 35-37°C por 24h;
- Leitura: As UFC são petras com ou sem brilho verde metálico (suspeita de *E. coli*), os outros CT (*Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*) apresentam UFC mucóides e com tendência a se confluírem.



Tubos LST positivos:

Exemplo
diluição 10-1
3 tubos positivos



10-1



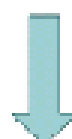
Cálculo
NMP

**Caldo
EC**

44,5 °C./24-48h

Caldo VBBL

35-37 °C/24-48h



ágar EMB

- **II. Indicadores microbiológicos: coliformes fecais na água e alimentos.**
- A água potável é isenta de microrganismos patogênicos e de bactérias indicadoras de contaminação fecal.
- Os indicadores de contaminação fecal, tradicionalmente aceitos, pertencem a um grupo de bactérias denominadas coliformes. O principal representante desse grupo de bactérias chama-se *Escherichia coli*. Outros gêneros são *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. A família é Enterobacteriaceae
- Avalia-se a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes, no caso, visando *E. coli*.
- Outra possibilidade é a contagem de bactérias heterotróficas em geral. A contagem padrão de bactérias não deve exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônias por 1 mililitro de amostra (500/UFQ/ml)

■ II. Aspectos gerais.

- Bactérias do grupo coliforme são bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos que fermentam a lactose a 35-37°C, produzindo ácido, gás e aldeído em um prazo de 24-48 horas. São oxidase-negativos e não formam esporos.
- Os coliformes totais são expressos em NMP/100 ml, que significa número mais provável de organismos / 100 ml.
- Justificativa:
 - - estão presentes nas fezes de animais de sangue quente, inclusive os seres humanos;
 - - sua presença na água possui uma relação direta com o grau de contaminação fecal. Permanecem mais tempo na água do que outras bactérias, sendo menos exigentes, mas não se multiplicam; são mais resistentes aos saneantes;

■

- **II. Indicadores microbiológicos: coliformes fecais.**
- - são facilmente detectáveis e quantificáveis;
- - O grupo dos coliformes é prático em termos de descrição: são G-, anaeróbicos facultativos, pequenos bacilos que fermentam lactose para produzir ácido e gás em 48 h a 35°C.
- - O subgrupo onde encontra-se *E. coli* é termotolerante. A incubação é feita a 44,5°C. Esta distinção é importante porque exclui os coliformes ambientais.
- - Mesmo no subgrupo de *E. coli*, é preciso diferenciar-se de outra bactéria, *Klebsiella*, por técnica específica.

- II. Indicadores microbiológicos: coliformes fecais.
- O uso de coliformes fecais como indicadores da qualidade da água remonta a 1892 e foi proposto por Shardingner
- Os indicadores são principalmente a contagem padrão e densidade.
- A contagem padrão é expressa em NMP. Na primeira fase, conclui-se o NMP para coliformes totais. Há o teste presuntivo (meio LST) e o teste confirmativo (meio BGLB).
- Depois procede-se o NMP para coliformes fecais (termotolerantes). Trata-se de um teste confirmativo com meio EC, incubado agora a 44-45°C.

■

- II. Indicadores microbiológicos: coliformes fecais.
- A seguir, pode-se confirmar que trata-se de *E. coli* com meio de cultura específico. Uma alça do tubo EC positivo é inoculada em placa de Petry com meio L-BEM, 18-24 h a 35°C. Cinco colônias suspeitas são novamente submetidas a inoculação e preparo de Gram. Pode resultar num NMP específico de *E. coli*.
- Algumas vezes é usada a simples presença de *E. coli*, por método colorimétrico.
- A FUNASA descreve metodologia baseada em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Estudar as etapas da detecção no manual da FUNASA.
-

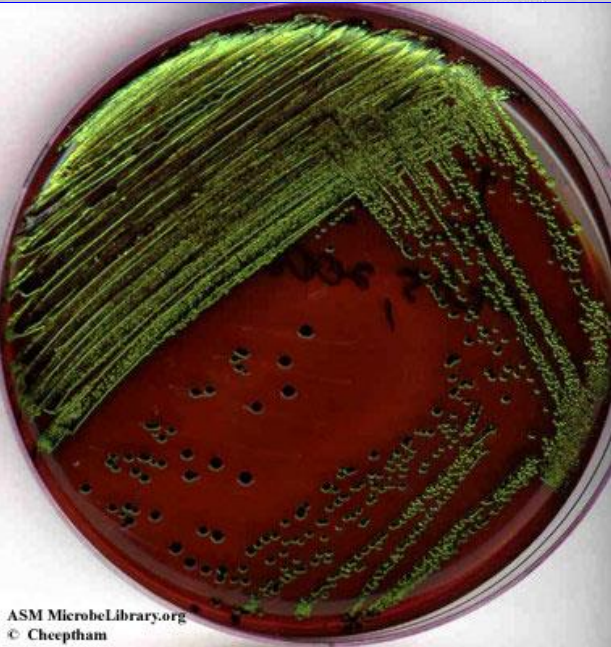


ASM MicroLibrary.org
© Cheeptham



Enterobacter

ASM MicroLibrary.org © Cheeptham



ASM MicroLibrary.org
© Cheeptham

Os tubos positivos no teste confirmativo (EC) são semeados para o meio EMB incubação :35-37°C por 24 h. Leitura: As UFC são pretas com brilho verde metálico (suspeita de *E. coli*).

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
Bacharelado em Gestão Ambiental
Componente curricular: Microbiologia Ambiental
Aula 12b

Professor Antônio Ruas

- 1. Créditos: 60**
- 2. Carga horária semanal: 4**
- 3. Semestre: 2°**
- 4. Testes bacterianos: *Vibrio fischeri***

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)
- O teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* foi elaborado para avaliação da qualidade da água e de sedimentos.
- *V. fischeri* é uma enterobactéria, Gram negativa, pertencente a família Vibrionaceae, uma grande família consistindo em muitas espécies, que são caracterizadas pela
- cooperação e interação com tecidos de outros animais.
- *V. fischeri* tem uma distribuição global, principalmente em águas temperadas e subtropicais onde ocupa uma variedade de nichos.
-

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)

- A bioluminescência produzida pela bactéria marinha *V. fischeri* é a base para vários bioensaios de toxicidade, onde é utilizada para avaliar desde a toxicidade de água contaminada, sedimentos de solo, água pluvial, entre outros.
- Em todos esses sistemas a toxicidade é avaliada medindo até que ponto a substância causa inibição sobre a emissão de luz pelas bactérias.
- De acordo com White (2000) bioluminescência é a emissão de luz por organismos vivos. Dentre os diversos organismos que emitem luz podemos encontrar representantes das algas (dinoflagelados), fungos, camarões, insetos, peixes e bactérias.

-

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)
- Embora alguns vivam no solo ou em ambientes de água doce, a maioria são organismos marinhos.
- De fato, a maioria das espécies que vivem a uma profundidade de aproximadamente 200 – 1000 metros são bioluminescentes.
- A vantagem de sobrevivência de um organismo específico que é bioluminescente sem dúvida nenhuma reflete no nicho desse organismo.
- Em alguns casos, bioluminescência é usada para comunicações intraespecíficas, para caçar ou atrair presas.
-

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)
- Com relação à bactéria luminescente é razoável sugerir que a habilidade para bioluminescência seja um fator para a bactéria ser alojada por um hospedeiro e assim conseguir um benefício no meio ambiente, inclusive nutrientes.
- Assim podemos imaginar que a bactéria que normalmente vive no intestino de peixes pode aumentar a probabilidade de ser ingerida se ela emitir luz num ambiente escuro de profundezas enquanto coloniza partículas que os peixes poderiam ver com mais facilidade e então ingeri-las.
- Bactérias marinhas luminescentes podem ser isoladas de intestinos de peixes e invertebrados, em crescimento saprófito em organismos marinhos mortos (peixes, crustáceos), principalmente em crescimento simbiótico nos órgãos leves de peixes, camarões em parte do plâncton.

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)
- São muitas as vantagens para o organismo que hospeda as bactérias luminescentes.
- Algumas espécies de bactérias luminescentes vivem em associação de simbiose nos órgãos leves de peixes. Órgãos leves nos peixes consistem em tubos ou canais, densamente preenchidos extracelularmente com bactérias, que conectam com o exterior por poros do qual a bactéria pode sair nos intestinos ou na água do mar, dependendo da localização do órgão leve.
- A maioria dos órgãos que abrigam bactérias, são internos e são derivados de extensões do trato intestinal.
- Provavelmente o objetivo desses órgãos internos leves seria no auxílio aos peixes numa iluminação controlada por eles.

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox®)
- A bactéria *V. fischeri* vive a densidades muito altas (aproximadamente 10^{11} células/mL).
- Também ocorre em vida livre no oceano, mas em densidades bem mais baixas (menores de 10^2 células/ml).
- Os resultados são apresentados como classificação em classes, conforme a toxicidade das amostras. A expressão é como:
 - CE_{20} , concentração da amostra que causa 20% de efeito tóxico (inibição de emissão de luz da bactéria).

- **Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***
- Esse teste se baseia na medida da luminescência produzida naturalmente por uma cultura de aproximadamente um milhão de células de *Vibrio fischeri*.
- Quando a bactéria entra em contato com substâncias tóxicas, as bactérias diminuem ou cessam a emissão de luz.
- Esta diminuição na emissão de luz pelas bactérias é medida em porcentagem de inibição da luminescência.
- Uma amostra é considerada tóxica quando a mesma causar uma inibição da luminescência igual ou maior que 20%, quando comparada com um controle negativo, que neste caso é uma solução de cloreto de sódio 2% (m/v).
- Como controle positivo do ensaio utiliza-se testes com solução de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg/L.

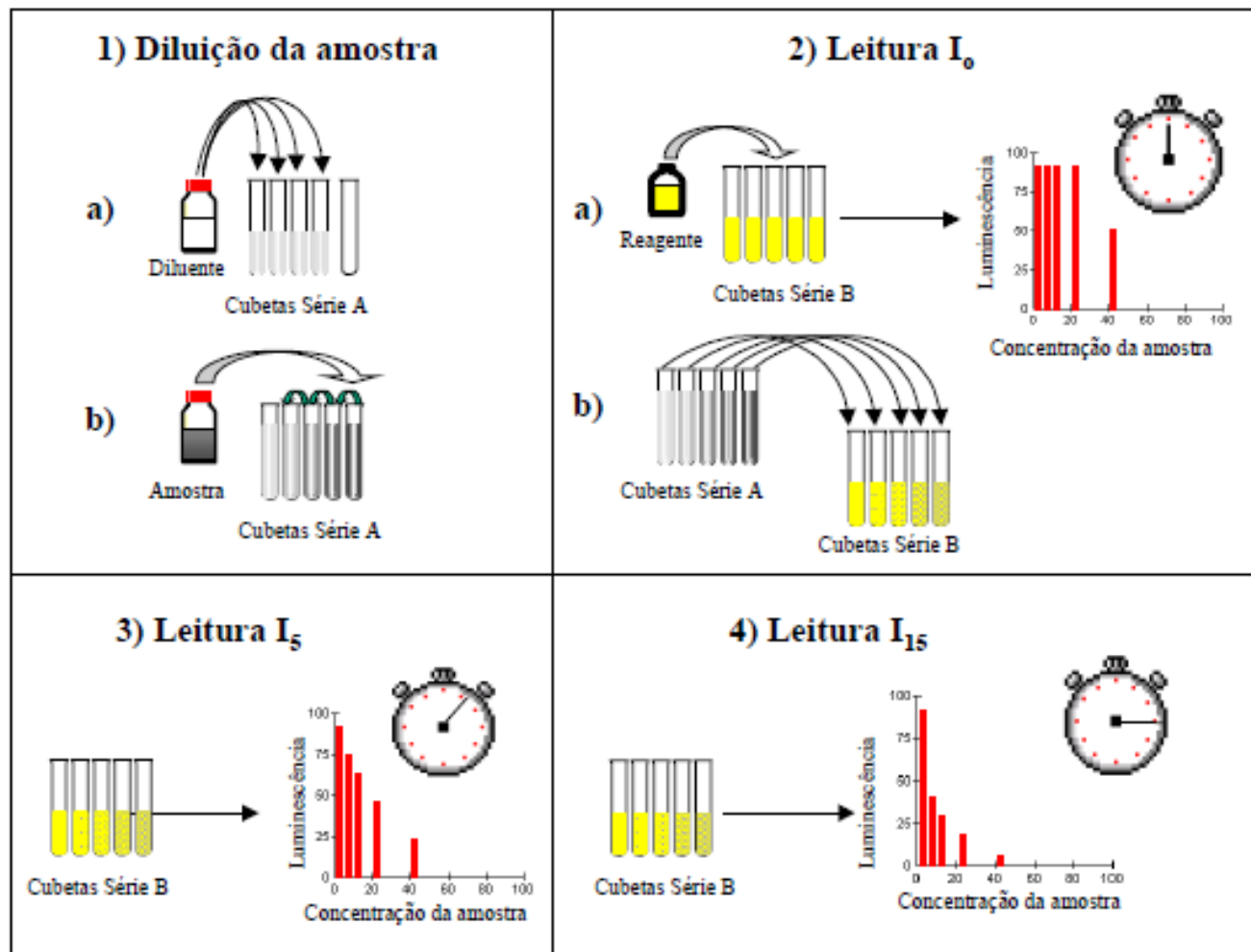


Figura 1 – Esquema do procedimento geral do teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *V. fischeri*.

- Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*
- O tempo de exposição é geralmente de 15 minutos.
- A emissão de luz é medida com um luminômetro de precisão.
- Exemplo de um artigo: 5 réplicas de solubilizado de areia, foram testados em dose única máxima e comparados com 5 réplicas do controle negativo (solução de NaCl 2% (m/v), a mesma utilizada para a solubilização das amostras).
- A cultura bacteriana liofilizada foi reconstituída, e diluída 1:10 em NaCl 2% (m/v) e volumes de 100 µL são transferidos para cada uma das dez cubetas-teste.
- Após 15 minutos de estabilização da bactéria, mede-se a luz emitida pela solução de bactéria.

- **Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***

- Então adiciona-se 900 µL da solução utilizada como controle negativo em cinco cubetas-teste e 900 µL do solubilizado da amostra nas outras cinco.

- Após 15 minutos, mede-se novamente a luz emitida.

- Calcula-se a média das leituras finais do controle negativo (X_c) e a média das leituras finais da amostra (X_a) e a porcentagem de inibição da luminescência (%) causada pela amostra, em relação ao controle, usando a seguinte fórmula:

- $$\% = (X_c - X_a \times 100) / X_c$$

- As amostras cujos resultados da inibição da emissão de luz da bactéria foram superiores a 20% foram consideradas tóxicas.

-

Tabela 1. Relação das amostras coletadas e os respectivos processos de moldagem.

Processo de moldagem	Empresa	Número de Amostras		
		Virgens	Residuais	
Areia verde (areia/bentonita/carvão)	A	2	4	
	B	1	2	
	F	1	2	
Areias ligadas quimicamente	Resina fenólica	B	1	2
		E	1	2
	Resina alquídica	C	1	2
	Resina furânica	D	2	4
Total		9	18	

Tabela 2. Médias da porcentagem de inibição das cinco réplicas dos solubilizados das amostras de areia virgem avaliadas pelo teste de toxicidade aguda com *V. fischeri*. Entre parênteses, intervalo de confiança 95%.

Amostra	Porcentagem de Inibição da Luminescência (%)
A	13 (7,2 a 17)
A2	5 (-1,7 a 12)
B	21 (17 a 26)
B2	2,6 (-1,3 a 6,6)
C	23 (18 a 28)
D	-0,8 (-13 a 11)
D2	-2,9 (-5,9 a 0,1)
E	14 (11 a 16)
F	0,6 (-5,4 a 6,6)

- **Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***

- No teste com areias, concluiu-se que o teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* foi eficiente para comparar as características das areias virgens com as areias descartadas de fundições com diferentes processos de moldagem, possibilitando ainda correlacionar os resultados com o ligante utilizado, diferenciando as amostras de areias verdes das areias ligadas quimicamente.
- Os resíduos provenientes dos processos de moldagem que empregam areias ligadas quimicamente apresentaram-se positivos para o teste utilizado.
- Mais estudos são necessários para se elucidar quais os compostos são responsáveis pela inibição de luz observada.

- **Outros aspectos do teste com *Vibrio fischeri***
- Em alguns trabalhos com efluentes, os resultados são apresentados como categorias de toxicidade do materia.
- Na tabela abaixo, observa-se estas categorias de acordo com a diluição do efluente. A diluição mínima neste modo é de 81,9%, acrescentando-se 1% de solução salina.

Tabela 16 - Classificação do teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Categoria	Ponderação
NÃO TÓXICA	$CE_{20} > 81,9\%$
MODERADAMENTE TÓXICA	$50\% < CE_{20} = 81,9\%$
TÓXICA	$25 < CE_{20} = 50\%$
MUITO TÓXICA	$CE_{20} = 25\%$

- **Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*: comparações com toxicidade sobre *Daphnia magna*.**

Tabela 7 - Resultados dos testes de toxicidade aguda no extrato solubilizado

Amostra	Fator de toxicidade	
	Bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>
Resíduo 01	16	128
Resíduo 02	128	4
Resíduo 03	32	16
Resíduo 04	2	2
Resíduo 05	32	32
Resíduo 06	8	1
Resíduo 07	8	2
Resíduo 08	64	4
Resíduo 09	16	2
Resíduo 10	64	128
Resíduo 11	256	128
Resíduo 12	4	8
Resíduo 13	16	4
Resíduo 14	2	4
Resíduo 15	2	4
Resíduo 16	2	8
Resíduo 17	32	8
Resíduo 18	32	4

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
Bacharelado em Gestão Ambiental
Componente curricular: Microbiologia Ambiental
Aula 12b

Professor Antônio Ruas

- 1. Créditos: 60**
- 2. Carga horária semanal: 4**
- 3. Semestre: 2°**
- 4. Testes bacterianos: *Salmonella* /microsossoma**

- **Teste de genotoxicidade Salmonella / microsoma**
- **OS PRINCÍPIOS DO TESTE DE AMES (SALMONELLA/MICROSOMO):**
- A avaliação das substâncias em relação à mutagenicidade e genotoxicidade são baseadas em uma combinação de testes que servem para a detecção dos possíveis danos genéticos associados a doenças humanas: mutação genética (mutações pontuais, ou seja, exclusões / inserções que afetam os genes); clastogenicidade, ou seja, alterações cromossômicas estruturais e aneuploidia (aberrações cromossômicas numéricas).
- Mesmo que se considere que nenhum único ensaio detecte todos os possíveis danos ao DNA, o teste de mutagenicidade (conhecido como teste de Ames) deveria ser aplicado a qualquer nova substância antes da mesma chegar à população.

- **Teste de genotoxicidade *Salmonella* / microssoma**
- O teste de Ames – desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores, – utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações em loci específico responsável pela biossíntese do aminoácido histidina, isto é, essas bactérias não sintetizam esse aminoácido e logo proliferam somente em meio de cultura acrescido do mesmo.
- O cientista percebeu que quando esses mutantes eram submetidos à ação de um agente mutagênico, o genótipo his- poderia ser modificado, revertido (his+).
- Em contato com o agente mutagênico, algumas células revertiam, passavam a proliferar e a formar colônias. A reversão indicava que existiam alterações nos códons permitindo à célula bacteriana sintetizar o aminoácido e multiplicar-se (Figura 1A e 1B).

• Teste de genotoxicidade Salmonella / microssoma

- Ames e seus colaboradores agruparam algumas dessas cepas de *S. typhimurium* com a intenção de serem usadas para determinação de substâncias com potencial mutagênico / carcinogênico.
- As cepas tinham como características:
 - (1) determinar o tipo de lesão no DNA;
 - (2) possuir um gene que confere aumento na permeabilidade da membrana (*rfa*) facilitando a entrada da substância teste pela célula bacteriana;
 - (3) apresentar mutação do tipo deleção no gene (*uvrB*) que confere reparo à luz UV evitando que a célula consertasse o dano induzido pelo agente teste;
 - (4) apresentar em plasmídeos, marcadores de resistência a antibióticos de forma seletiva evitando contaminação por outras bactérias.

- **Teste de genotoxicidade *Salmonella* / microssoma**
- O princípio do teste é a detecção de colônias bacterianas que se formam em meio nutriente de composição definida e tornou-se muito difundido e internacionalmente aceito e exigido pelos órgãos que regulamentam o uso de fármacos, cosméticos, pesticidas, e até alimentos, entre outras aplicações.
- As cepas padrão de *S. typhimurium* sugeridas para o ensaio são TA97, TA98, TA100 e TA102. No entanto, outras cepas são comparativamente usadas com estas, como as cepas TA1535 e TA1538 para TA100 e TA98, respectivamente.

Tabela 1- Características genotípicas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de teste de Ames:

Cepa	Mutação em <i>His</i>	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA97	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Frameshift	Adição de um par G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Frameshift	Deleção de um par G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA102	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	pKM101, pAQ1	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA1535	<i>hisG46</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA1537	<i>hisC3076</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Frameshift	Adição de um par G:C
TA1538	<i>hisG46</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	Frameshift	Deleção de um par G:C

- **Teste de genotoxicidade *Salmonella* / microsoma**
- O teste portanto, emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA.
- Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido.
- A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico.

- **Teste de genotoxicidade *Salmonella* / microsossoma**
- A ativação metabólica dos genotóxicos e carcinogênicos é fundamental no teste e decorre da adição de fragmentos do microsossoma, ou microsossomais, de mamíferos.
- Microsossomas são áreas ou partes do Retículo Endoplasmático responsáveis pela metabolização de moléculas tóxicas. O microsossoma usado é de ratos.
- Desta forma o teste com bactérias simula o que ocorreria no organismo humano.

• Teste de genotoxicidade *Salmonella* / microsossoma

- Os compostos químicos podem ser testados diretamente ou dissolvidos em solventes apropriados, como por exemplo água destilada ou dimetilsulfóxido (DMSO).
- As amostras ambientais líquidas como água bruta, tratada e efluentes podem ser testadas diretamente após esterilização por membrana filtrante, porém são mais usualmente submetidas a processos de concentração e extração orgânica.
- Existem vários métodos de extração orgânica, cada um sendo preferencial para determinados grupos de substâncias químicas, devendo-se, portanto, escolher o método mais apropriado para o tipo de amostra a ser analisada.



ENSAIO *SALMONELLA*/MICROSSOMA

- Teste de curta duração \Rightarrow potencialidade carcinogênica de substâncias químicas
- Alta Correlação \Rightarrow organismos superiores

Aplicação: substâncias puras, fármacos
insumos agrícolas

Uso em diagnóstico ambiental

Utilizado em várias matrizes ambientais



LEGISLAÇÃO



Ensaio *Salmonella*/microsossoma



ENSAIO *SALMONELLA*/MICROSSOMA

- ⇒ Contínuo aprimoramento ⇒ validação internacional
- ⇒ Ferramenta fundamental no conjunto de testes que definem a potencialidade de compostos cancerígenos genotóxicos

Revertentes para histidina

⇒ Diferentes tipos de mutações no *operon* da histidina

GENOTOXICIDADE

- ✓ Teste de Ames - Ensaio *Salmonella*/microsoma

Metabolização hepática: fração microsossomal S9



Degrada as substâncias tornando-as menos complexas; expressão da atividade mutagênica de substâncias que precisam ser metabolizadas



GENOTOXICIDADE

✓ Teste de Ames - Ensaio *Salmonella*/microsossoma

✓ SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

✓ AMOSTRAS DE ÁGUA – rios, efluentes industriais

✓ AMOSTRAS AMBIENTAIS SÓLIDAS – resíduos, sedimentos e solos

✓ COMPARTIMENTO ATMOSFÉRICO

gases e material particulado

✓ Intensidade por unidade de amostra:

porção linear da curva dose-resposta; expresso como número de rev/g/L/m³

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

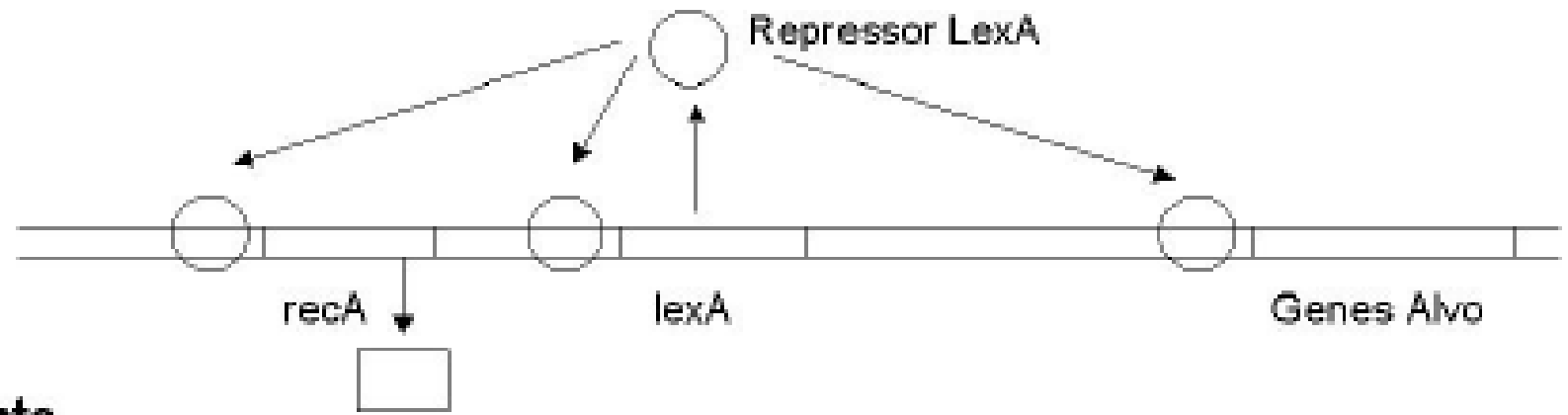
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA PELO TESTE
SALMONELLA/MICROSSOMA E DETERMINAÇÃO DE
CONTAMINANTES QUÍMICOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA
SUPERFICIAL DA BACIA DO GUAÍBA**

Tabela 1 - Utilização do teste Salmonella/Microsossoma na detecção de contaminantes de água com potencial genotóxico

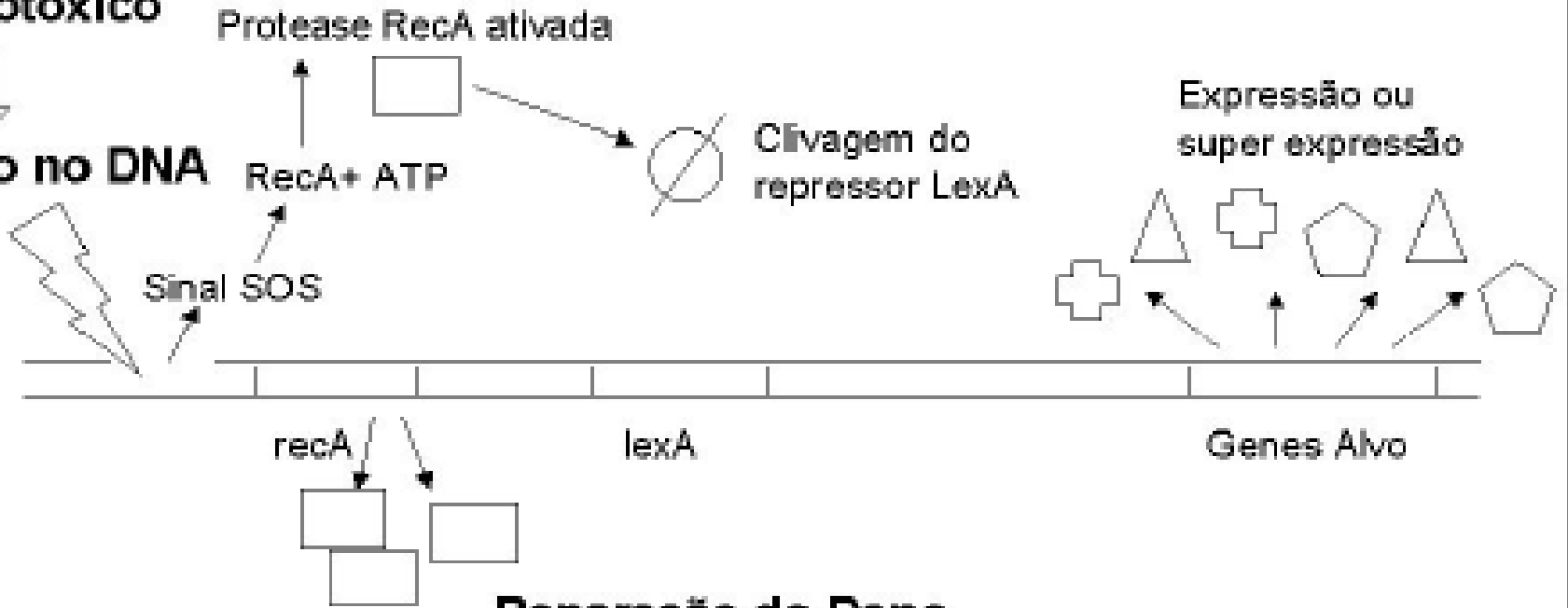
<i>Autor/ano</i>	<i>Amostra</i>	<i>Contaminação</i>	<i>Resultado</i>
VARGAS et al., 1988; 1993; 1995	Rio Caí, Brasil	Industrial, rural e urbana	Genotóxico
ROLLA, 1995	Lago Guaíba, Brasil	Indústria de polpa e papel	Não Genotóxico
FILIPIC, 1995	Rio Sora, Slovênia	urbana e agrícola	Genotóxico

Sistema Desligado



Agente Genotóxico

Dano no DNA



Reparação do Dano

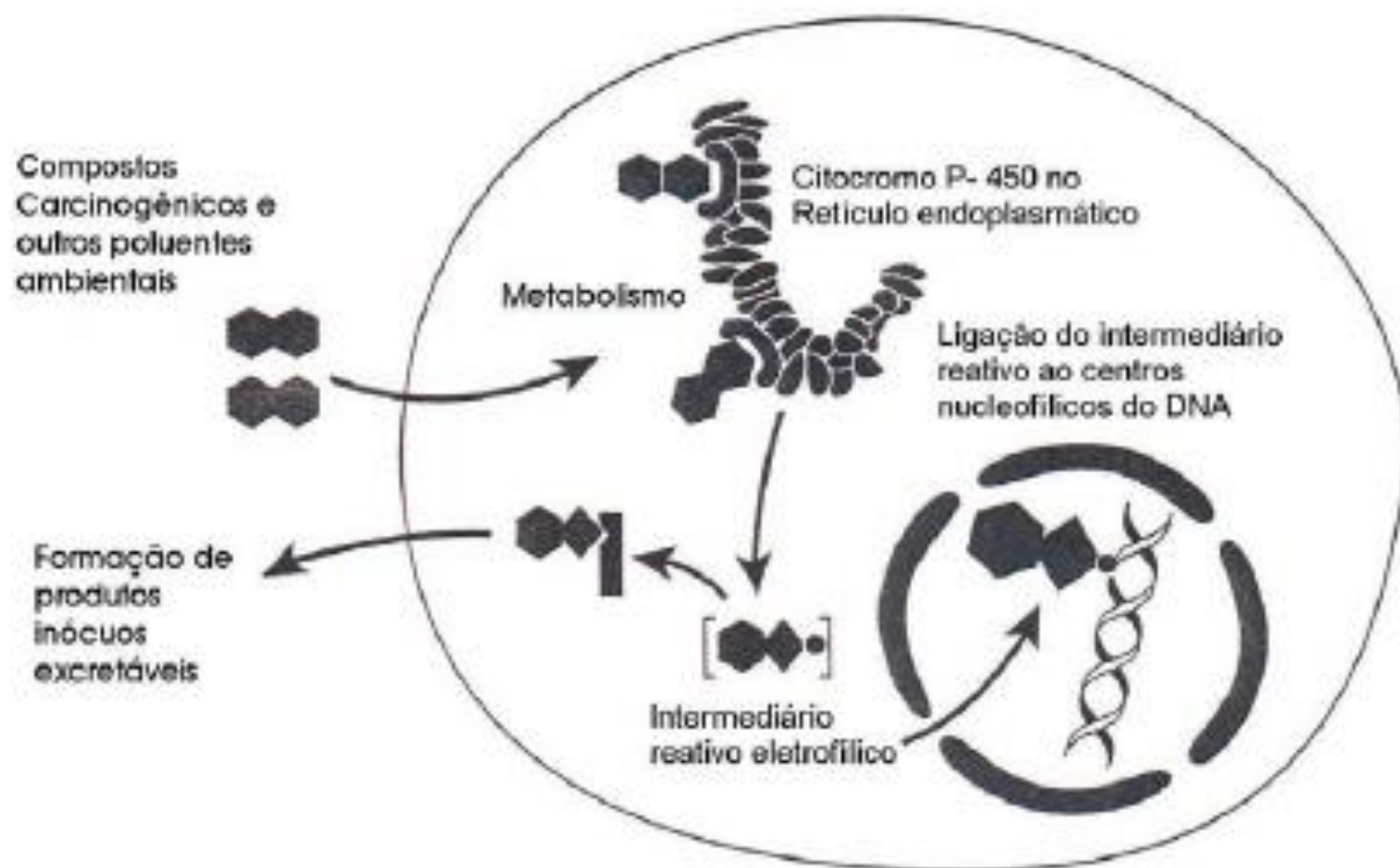


Figura 2 – Esquema mostrando ativação metabólica de compostos policíclicos apolares pelo sistema do citocromo P – 450 em uma célula típica de mamífero, formando intermediários reativos que se ligam aos centros nucleofílicos do DNA (Adaptado de FRIEDBERG et al., 1995).