

Aula Prática 09: MÉTODOS FÍSICOS E QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

A. Ação do calor

- 1) Sobre a bancada, há 4 tubos de ensaio, sendo 2 tubos da **bactéria 1** e 2 tubos da **bactéria 2**.
- 2) Nomeie somente um tubo de cada bactéria como “Autoclavado” e leve-o **imediatamente** à autoclave, para ser autoclavado por 20 min, à 1 atm, 120 °C.
- 3) Enquanto espera-se a autoclavação, prossiga com as demais etapas.
- 4) Para cada bactéria, serão utilizadas 2 placas de Petri contendo Ágar nutriente. Divida em 3 partes o fundo plástico de cada placa de Petri.
- 5) Nomeie cada placa com a bactéria utilizada, e uma região da placa como: 0 min; 5 min; 10 min; 15 min; 20 min ou Autoclavado.
- 6) **Para o tempo de 0 min:** Sem ferver o tubo, retire uma alíquota da bactéria e semeie, por estriamento, na respectiva região da placa de Petri.
- 7) **Para o tempo de 5 min:** Incube o mesmo tubo de ensaio por **5 min** em água fervente. Em seguida, retire uma alíquota e semeie.
- 8) **Para o tempo de 10 min:** Incube o mesmo tubo de ensaio por **mais 5 min** em água fervente. Em seguida, retire uma alíquota e semeie.
- 9) **Para o tempo de 20 min:** Incube o mesmo tubo de ensaio por **mais 5 min** em água fervente. Em seguida, retire uma alíquota e semeie.
- 10) **Para o tubo autoclavado:** Espere o tubo esfriar, retire uma alíquota e semeie.
- 11) Incube as placas de Petri a 37 °C por 24 h.
- 12) Complete a tabela 1 a seguir de acordo com a seguinte legenda:

Para placa com crescimento negativo: -

Para placa com crescimento positivo: se possível, determine o número de UFC. Caso contrário, utilize:

+++	impossível contar, formou um “tapete”
++	impossível contar, mas tem visualmente menos que +++
+	impossível contar, mas tem visualmente menos que ++

Tabela 1. Resultados da ação do calor nas bactérias 1 e 2.

	0 min	5 min	10 min	20 min	Autoclavado
Bactéria 1					
Bactéria 2					

- 13) Descreva e justifique os resultados.
- 14) O que confere a maior resistência térmica dos endósporos, em comparação às formas vegetativas?

B. Ação de antissépticos e desinfetantes

- 1) Nomeie cada tubo de ensaio de acordo com os dados discriminados para cada grupo (Tabela 2).
- 2) Transfira 0,5 mL de um cultivo da **bactéria 3** (contendo cerca de 10^9 UFC/mL) para cada um dos 5 tubos de ensaio contendo Caldo Nutriente.
- 3) Adicione a quantidade pedida de antisséptico ou de desinfetante no respectivo tubo de ensaio.
- 4) Homogeneíze o conteúdo de cada tubo.
- 5) Incube os tubos a temperatura ambiente por 15 min.
- 6) Para cada tubo, transfira 100 μ L de uma alíquota para uma Placa de Petri contendo Ágar Nutriente e espalhe o inóculo homogeneamente em toda a superfície do meio sólido com a alça de Drigalski.
- 7) Incube os tubos e as placas de Petri a 37 °C por 24 h.
- 8) Preencha as Tabelas 3 e 4 com os dados de **TODOS** os grupos.
- 9) Compare a eficiência de **TODOS** os antissépticos e desinfetantes quanto à ação antimicrobiana. Justifique baseando-se na indicação de uso e no mecanismo de ação do princípio ativo de **CADA** produto.

Tabela 2. Volumes de antissépticos ou desinfetantes a serem utilizados por cada grupo.

Grupo	Produto	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
1	Água sanitária	-	50 μ L	75 μ L	100 μ L	125 μ L
2	Mr. Músculo Limpador com Perfumes by Glade	-	100 μ L	150 μ L	200 μ L	250 μ L
3	Água oxigenada 10 vol. ADV	-	250 μ L	300 μ L	350 μ L	400 μ L
4	Álcool iodado a 0,1%	-	75 μ L	125 μ L	250 μ L	500 μ L
5	Sabonete líquido	-	500 μ L	1 mL	2 mL	4 mL
6	Detergente neutro	-	500 μ L	1 mL	2 mL	4 mL
7	Enxaguante Bucal	-	2 mL	3 mL	3,5 mL	4 mL
8	Mr. Músculo Cozinha Total - Desengordurante	-	500 μ L	1 mL	1,5 mL	2 mL
9	Pinho Sol	-	75 μ L	125 μ L	250 μ L	500 μ L
10	Álcool 46 ° GL	-	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL

Tabela 3. Resultados dos antissépticos ou desinfetantes de cada grupo. Complete a tabela de acordo com a seguinte legenda:

Para placa com crescimento negativo: -

Para placa com crescimento positivo: se possível, determine o número de UFC.
Caso contrário, utilize:

+++	impossível contar, formou um “tapete”
++	impossível contar, mas tem visualmente menos que +++
+	impossível contar, mas tem visualmente menos que ++

Grupo	Produto	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
1	Água sanitária					
2	Mr. Músculo Limpador com Perfumes by Glade					
3	Água oxigenada 10 vol. ADV					
4	Álcool iodado a 0,1%					
5	Sabonete líquido					
6	Detergente neutro					
7	Enxaguante Bucal					
8	Mr. Músculo Cozinha Total - Desengordurante					
9	Pinho Sol					
10	Álcool 46 ° GL					

Tabela 4. Dados dos antissépticos ou desinfetantes de cada grupo.

Grupo	Produto	Ingrediente(s) ativo(s)	Mecanismo de ação	Indicação: Antisséptico? Desinfetante?
1	Água sanitária Barbarex a 1%			
2	Mr. Músculo Limpador com Perfumes by Glade			
3	Água oxigenada 10 vol. ADV			
4	Álcool iodado a 0,1%			
5	Sabonete líquido			
6	Detergente neutro			
7	Enxaguante Bucal			
8	Mr. Músculo Cozinha Total - Desengordurante			
9	Pinho Sol			
10	Álcool a 70% ou a 92,8% (*)			

C. Ação de antibióticos (Teste de antibiograma pelo Método de Kirby-Bauer)

- 1) Retire 0,5 mL da **bactéria 3** e transfira para um tubo de ensaio vazio.
- 2) Adicione uma **pequena quantidade** de meio Caldo Nutriente estéril no tubo contendo 0,5 mL da bactéria para diluir a suspensão.
- 3) Homogeneíze o meio e verifique sua turbidez posicionando uma folha de papel impressa atrás do tubo e observando por transmissão as letras impressas.
- 4) Adicione o meio Caldo Nutriente estéril até que a identificação das letras seja evidente.
- 5) Transfira 100 µL da suspensão diluída da bactéria para uma placa de Petri com meio Mueller Hinton (MH) e espalhe o inóculo homogeneamente em toda a superfície do meio sólido com a alça de Drigalski.
- 6) Com o auxílio de uma pinça estéril, posicione os 4 discos de papel filtro impregnados com antibióticos (10 µg de ampicilina, 10 µg de gentamicina, 30 µg de tetraciclina ou 30 µg de vancomicina) na placa e pressione-os levemente. Coloque os discos de forma equidistante para que, posteriormente, seja possível medir os halos de inibição (Figura 1).
- 7) Incube as placas a 37 °C por 24 h.
- 8) Com uma régua, meça o diâmetro do halo de inibição para cada antibiótico e compare os valores com os dados da Tabela 5.
- 9) Explique qual o mecanismo de ação de cada antibiótico.
- 10) A que se deve a resistência de alguns microrganismos, como *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*, à vancomicina?

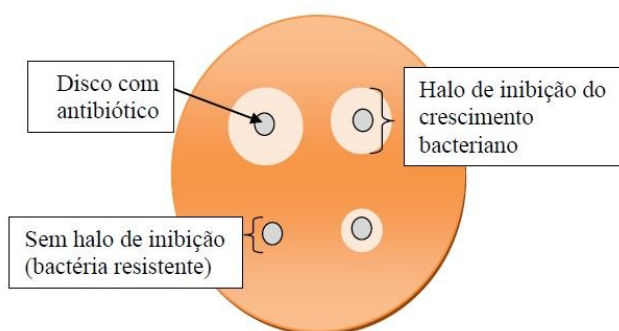


Figura 1. Representação da placa de Petri com os discos de papel embebidos em antibióticos após o período de incubação. Note que há halos de inibição de diferentes tamanhos.

Tabela 5. Interpretação dos resultados do teste de antibiograma pelo método de disco difusão.

Antimicrobiano	Resultado	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.faecalis</i> JH2-2	Resultado do grupo
Ampicilina (10 µg)	Sensível	≥ 17 mm	≥ 17 mm	
	Intermediário	14 - 16 mm	--	
	Resistente	≤ 13 mm	≤ 16 mm	
Gentamicina (10 µg)	Sensível	≥ 15 mm	*	
	Intermediário	13 - 14 mm	*	
	Resistente	≤ 12 mm	*	
Tetraciclina (30 µg)	Sensível	≥ 15 mm	≥ 19 mm	
	Intermediário	12 - 14 mm	15 - 18 mm	
	Resistente	≤ 11 mm	≤ 14 mm	
Vancomicina (30 µg)	Sensível	**	≥ 17 mm	
	Intermediário	**	15 - 16 mm	
	Resistente	**	≤ 14 mm	

* Testar somente com altas doses, pois em baixas concentrações pode ser ativa *in vitro*, mas não *in vivo*.

** Não recomendada para bactérias gram-negativas.

Observações

- 1) Os *breakpoints* de cada antibiótico são distintos para as diferentes classes de bactérias.
- 2) É importante medir corretamente os halos de inibição, pois 1 mm faz diferença na análise dos resultados.
- 3) CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) é um órgão americano que regulamenta o uso e testes dos antimicrobianos. Na Europa, o órgão equivalente é o EUCAST. No Brasil, seguimos as normas do CLSI.