

Escola Secundária Camilo Castelo Branco
Vila Nova de Famalicão, Maio de 2010
Biologia 12º ano



E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Elaborado por:

Daniela Azevedo nº 10

Elisabete Santos nº 11

Joana Costa nº 14

Soraia Silva nº 27

12ªE

Professor: Hélder Silva



“E quando os antibióticos não funcionam?”

Biologia 12ºE 09/10

1. Introdução

No âmbito da disciplina de Biologia do 12^o ano foi-nos proposta a actividade do projecto *Ciência Viva: “E quando os antibióticos não funcionam?”*. Nesta actividade, inicialmente, tivemos de seleccionar um rio (Ave), em seguida recolhemos uma amostra de água e ao fim de vários procedimentos tentamos isolar fagos presentes na água do rio Ave pondo-os posteriormente em contacto com a estirpe de bactérias *E.coli* que nos foi fornecida, para no final podermos concluir se os fagos poderão ser usados como alternativa aos antibióticos.

A realização desta actividade compreendeu diversas etapas:

1. Preparar os meios de cultura;
2. Seleccionar o rio e recolher a amostra de água;
3. Proporcionar o crescimento das bactérias existentes na amostra de água (caso existam);
4. Verificar se houve crescimento bacteriano e caso tenha existido, proceder ao isolamento das bactérias;
5. Isolar os fagos;
6. Aplicação dos fagos provenientes da amostra de água do rio Ave em contacto com a estirpe *E.coli* fornecida e com a estirpe que isolamos.

1.1. Enquadramento Teórico

Os antibióticos são medicamentos que inibem ou anulam o crescimento bacteriológico, no entanto algumas [bactérias](#) já apresentam resistência aos antibióticos existentes. Desta forma, são necessárias alternativas ao combate de bactérias e uma alternativa é o uso de [fagos](#). Os fagos co-evoluíram com as próprias bactérias e podem ser exploradas no combate a estas, incluindo aquelas que são resistentes ao antibióticos (1). Desta forma, os fagos podem ser usados no tratamento de infecções bacterianas, como agentes terapêuticos evitando recorrer aos antibióticos. Uma das vantagens da utilização de fagos em vez dos antibióticos é que o uso dos fagos raramente apresenta efeitos secundários, tendo em conta que não afectam células eucarióticas, pois os fagos são constituídos por proteínas e ácidos nucleicos e a degradação destes origina aminoácidos e bases azotadas (1), estes são considerados entidades naturais ao contrário dos antibióticos que tem impactos ambientais negativos. Outra vantagem do uso de fagos como alternativa aos antibióticos é o facto de uma das causas da crescente resistência bacteriana ser o uso excessivo de antibióticos.

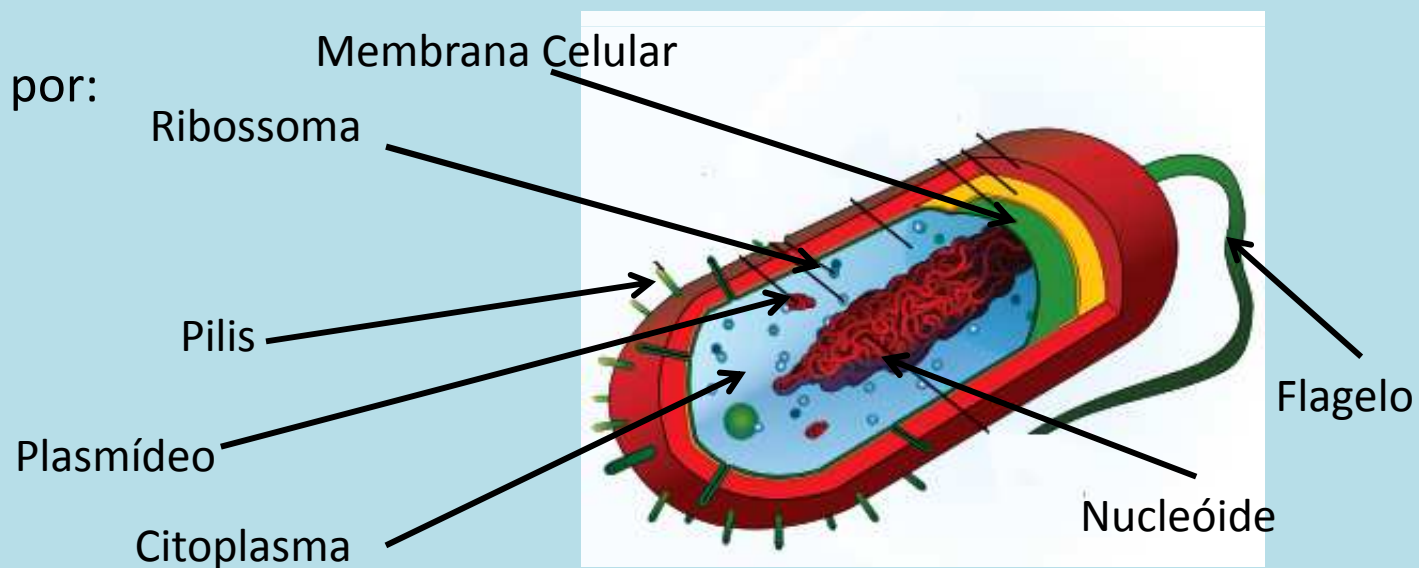
(1) Informação retirada do Protocolo do projecto Ciência Viva: “E quando os antibióticos não funcionam” (Página 1)

1.1. Enquadramento Teórico

O que são bactérias?

Bactérias são organismos unicelulares, procariontes (não possuem invólucro nuclear, nem organelos). Podem ser encontrados na forma isolada ou em colónias. Podem viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias), ou ainda serem anaeróbias facultativas.

São constituídas por:

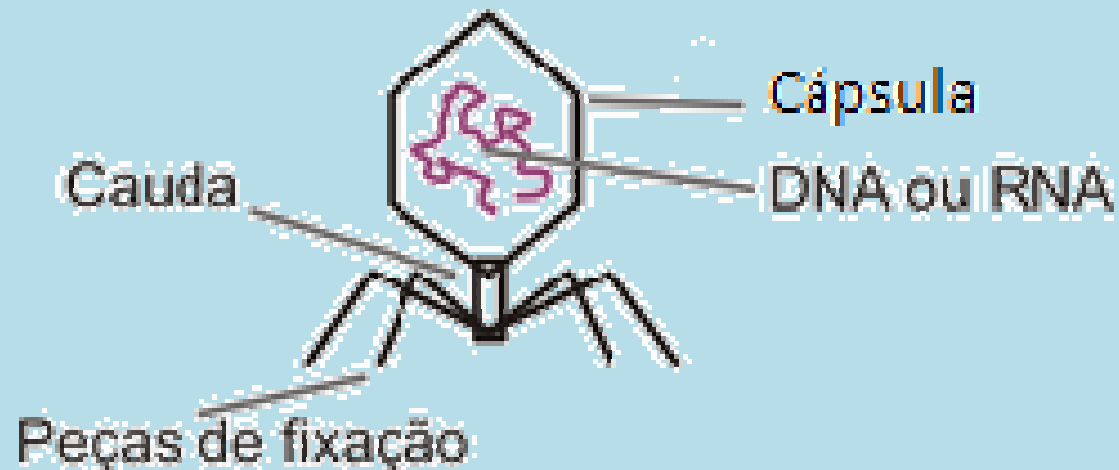


1.1. Enquadramento Teórico

O que são fagos?

Os bacteriófagos (fagos), são vírus que infectam e lisam as bactérias, replicando-se exponencialmente durante esse processo, sem no entanto atacarem outras células ou organismos. Os fagos ocupam todos os habitats onde se podem encontrar os seus hospedeiros.

São constituídos por:

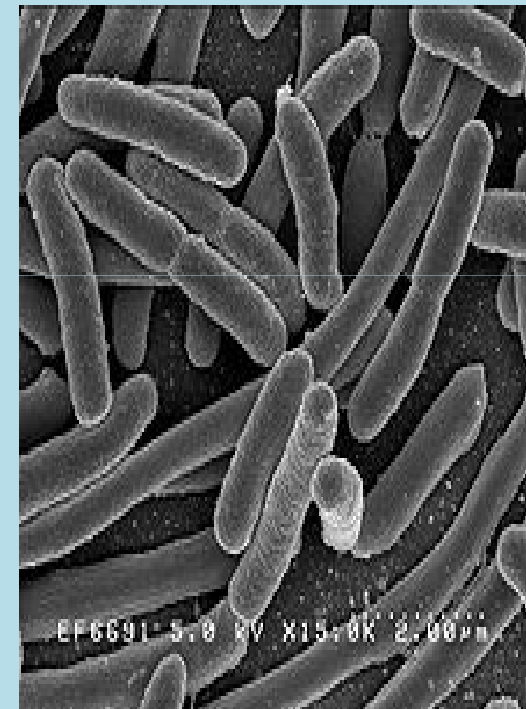


1.1. Enquadramento Teórico

Porquê a *E.coli*?

Para realizar esta actividade foi necessário usarmos uma bactéria. A bactéria que utilizamos foi a *Escherichia coli* (*E.coli*), pois esta apresenta as seguintes características:

- Fácil obtenção nos cursos de água;
- A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas;
- Facilidade de crescimento e reprodução (divisão em 20 minutos);
- Como a *E. coli* tem a capacidade de sobreviver por breves períodos no exterior do organismo dos animais, é considerado o organismo ideal a utilizar como indicador de contaminação fecal em amostras de água naturais;
- Faz parte da flora intestinal do ser humano, por isso, na presença de fagos, pode ter o mesmo comportamento que outras bactérias entéricas patogénicas.



1.1. Enquadramento Teórico

Porquê o rio Ave?

Para a realização desta actividade foi necessário escolhermos um rio para retirarmos uma amostra de água. O rio escolhido por nós foi o rio **Ave**. A escolha deste rio deveu-se a vários factores tais como:

- O facto de ser um dos rios mais poluídos da Europa e assim a existência de bactérias estava garantida;
- Passar na nossa localidade (Fradelos - V.N. Famalicão)
- Ser um rio de fácil acesso para se efectuar a recolha da água.



1.2. Procedimento Geral

Este trabalho é constituído por 4 actividades distintas:

1. Preparação do material e dos meios de cultura

Nesta primeira actividade preparamos todo o material (incluindo os meios de cultura) necessário para a realização das actividades seguintes.

2. Isolamento e purificação de *E. coli* de amostras de água do rio seleccionado (Ave)

Nesta actividade recolhemos uma amostra de água do rio Ave com o objectivo de determinar se essa água terá sido contaminada por alguma fonte de poluição orgânica e se ela pode ser utilizada para consumo humano directo.

3. Isolamento e purificação de fagos patogénicos para a *E.coli*

Nesta actividade isolamos fagos (vírus de bactérias), que são microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, quando as bactérias se revelam resistentes aos antibióticos.

4. “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados

Nesta actividade determinamos o painel de hospedeiros que cada fago e sua eficiência de plaqueamento.

1.2. Procedimento Geral

“**Host Range**” é o conjunto de géneros, espécies e estirpes bacterianas que um fago é capaz de infectar

“**EOP**” (eficiência do plaqueamento) é dado pela razão entre a concentração do fago numa determinada estirpe e a concentração máxima observada em qualquer estirpe bacteriana.

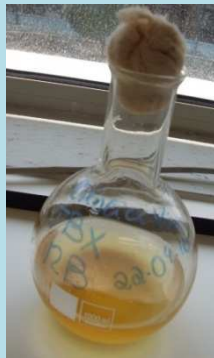
2. Actividades

2.1. Actividade 1 – Preparação do material e meios de cultura

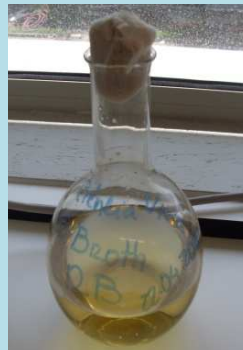
Nesta actividade preparamos o material que necessitávamos para a realização das actividades bem como os meios de cultura que iríamos precisar:



LB-10x



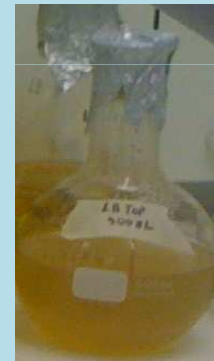
TBX



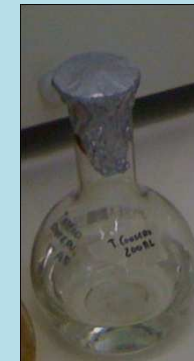
LB Broth



LB Agar



LB Top



Tampão de
conservação

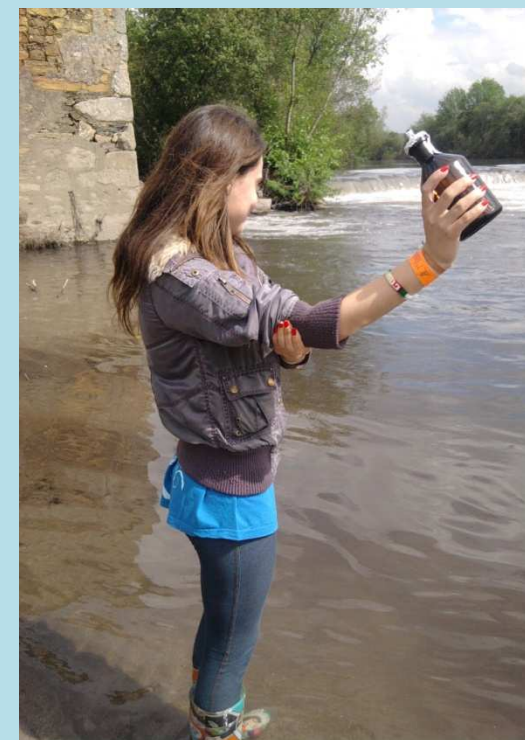


Soro
Fisiológico

2.2. Actividade 2 – Isolamento e purificação de E. coli de amostra de água

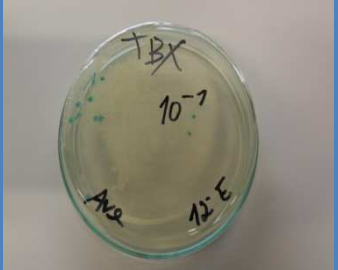
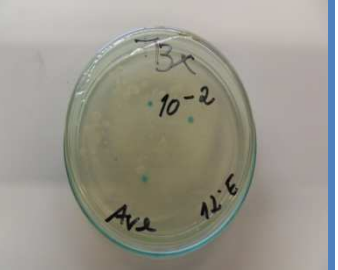
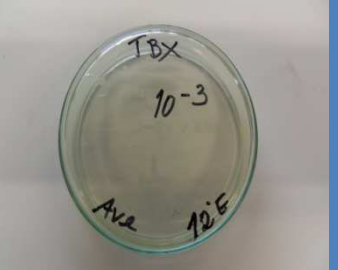
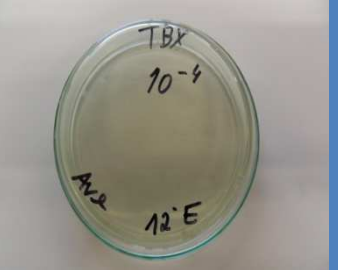
Nesta actividade recolhemos uma amostra de água do rio Ave com o objectivo de determinar se essa água terá sido contaminada por alguma fonte de poluição orgânica e se ela pode ser utilizada para consumo humano directo. No final desta actividade também contamos o número de colónias formadas em cada placa de petri e calculamos o CFU/ml.

Metodologia: Inicialmente recolhemos a amostra de água com um frasco devidamente esterilizado. Em seguida, efectuamos diluições da amostra de água do rio até à diluição 10^{-4} e posteriormente procedemos ao plaqueamento para verificar se havia crescimento bacteriano. No final de verificarmos o crescimento das bactérias existentes na amostra de água, procedemos à repicagem da colónia de bactérias verdes que estava mais individualizada (placa 10^{-2}). Efectuamos três repicagens até se obterem colónias de aspecto semelhante.



2.2. Actividade 2 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para E. coli

Resultados:

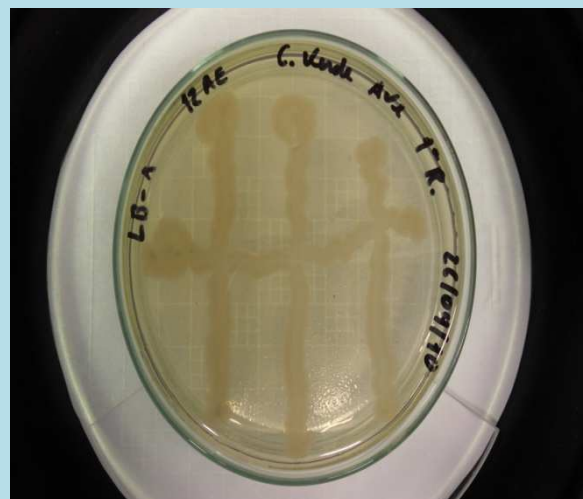
Diluição	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
				
Numero de colónias	341	132	16	3
CFU/ml	34100	132000	160000	300000

2.2. Actividade 2 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para E. coli

Repicagem da colónia de bactérias verdes:



1ª repicagem



2ª repicagem



3ª repicagem

2.2. Actividade 2 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para *E. coli*

Conclusão: Nesta actividade podemos concluir que na amostra de água existiam bactérias de pelo menos duas estirpes de bactérias (verdes e brancas) e que estas se multiplicavam mais nas duas primeiras diluições. O meio TBX como era selectivo, evidenciava as colónias de bactérias *E. coli* ao tornarem-se verdes.

Desta forma, podemos afirmar que o local onde recolhemos a água estava contaminado devido possivelmente a despejos industriais e agrícolas não podendo assim ser fonte de água para consumo, pois o consumo desta pode causar doenças graves.



2.3. Actividade 3 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para *E. coli*

Nesta actividade tínhamos como objectivo isolar fagos (vírus de bactérias), que são microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, quando as bactérias se revelam resistentes aos antibióticos.

Metodologia: Começamos por isolar fagos existentes na amostra de água específicos para as estirpes de bactérias do rio Ave. No entanto, uma amostra pode possuir fagos numa concentração suficiente para ser plaqueada directamente ou então, os fagos podem estar em concentrações elevadas, sendo necessário diluir a amostra antes de plaquear. Os fagos isolados são específicos para a bactérias *E. coli* B (fornecida).

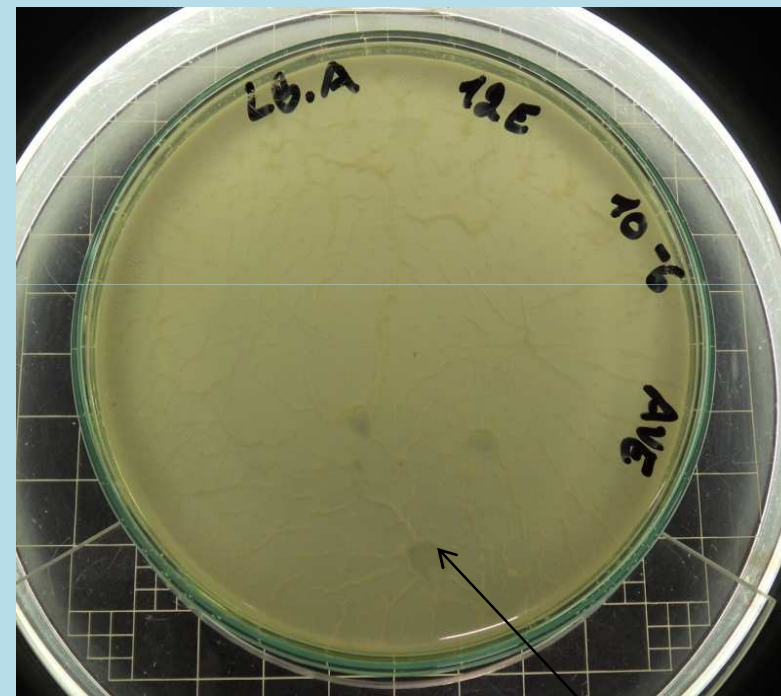
2.3. Actividade 3 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para E. coli

Resultados:



1ª Diluição

Placas de lise
pequenas



2ª Diluição

Placas de lise
grandes

2.3. Actividade 3 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para E. coli

Conclusão: Nesta actividade efectuamos duas diluições, tendo obtido mais placas de lise nas primeiras diluições. O fago que conseguimos isolar é específico para aquela estirpe (E.coli B), pois verificou-se a existência de bastantes placas de lise.

2.4. Actividade 4 - “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados

O objectivo desta actividade foi determinar o painel de hospedeiros que cada fago e sua eficiência de plaqueamento.

Metodologia: Nesta actividade utilizamos o fago que tínhamos usado na actividade anterior e colocámo-lo em contacto com a estirpe de E.coli do rio e a estirpe de E.coli B fornecida pelo Ciência Viva. Em seguida, verificamos se os fagos actuaram, ou seja, se houve a formação de placas e lise em ambas as situações.

2.4. Actividade 4 - “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados

Resultados:

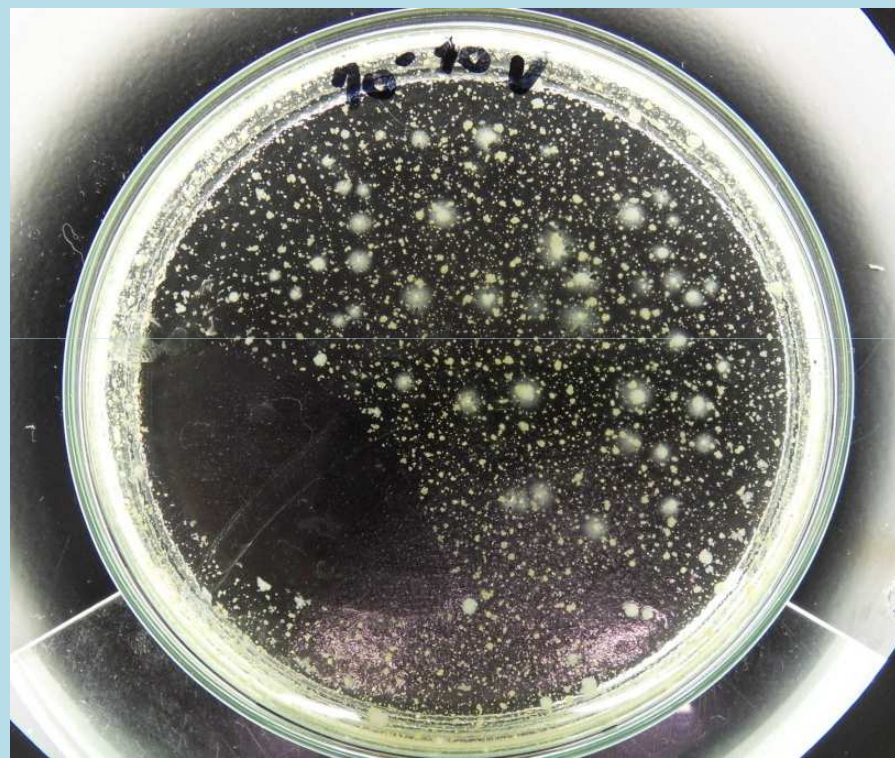
Diluição	E.coli B	E.coli do rio
10^{-1}	Tem placas de lise	Tem poucas placas de lise
10^{-2}	Tem poucas placas de lise	Tem poucas placas de lise
10^{-3}	Tem bastentes placas de lise	Tem placas de lise
10^{-4}	Não tem placas de lise	Não tem placas de lise
10^{-5}	Não tem placas de lise	Não tem placas de lise
10^{-6}	Tem placas de lise	Não tem placas de lise
10^{-7}	Não tem placas de lise	Tem placas de lise
10^{-8}	Não tem placas de lise	Não tem placas de lise
10^{-9}	Não tem placas de lise	Não tem placas de lise
10^{-10}	Não tem placas de lise	Não tem placas de lise

2.4. Actividade 4 - "Host Range" e "EOP" dos fagos isolados

Resultados:



Cultura de *E. coli* B com fagos específicos para a mesma



Cultura de *E. coli* do rio Ave (verde) com fagos específicos para a *E. coli* B

2.4. Actividade 4 - “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados

Resultados:

+	Fagos específicos para a <i>E.coli B</i> (fornecida)
Estirpe de <i>E. coli B</i>	Verificamos que na maioria das placas de petri os fagos actuaram pois houve a formação de placas de lise.
Estirpe de <i>E. coli</i> do rio	Verificamos que na maioria das placas os fagos não actuaram pois em quase nenhuma das placas de petri houve a formação de placas de lise.

2.4. Actividade 4 - “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados

Conclusão: Com esta actividade, concluímos que os fagos isolados eram específicos para a estirpe de *E. coli* B (fornecida), tendo-se formado placas de lise em quase todas as diluições. Já nas placas com *E. coli* do rio Ave (*E. coli* Verde), não se verificou a actuação dos fagos na maioria das diluições, não se formando praticamente placas de lise nenhuma. Assim, podemos concluir, que a estirpe de *E. coli* isolada do rio Ave é diferente da *E. coli* que nos foi fornecida. Também podemos concluir que a EOP não é tão grande na colónia de *E. coli* do rio como na *E. coli* B (fornecida).

3. Conclusão Final

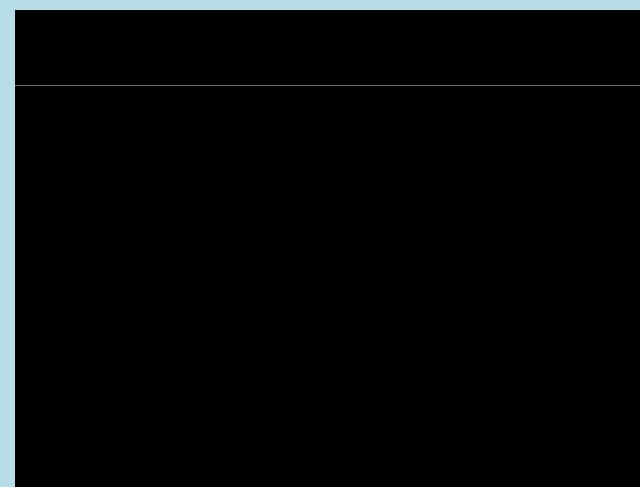
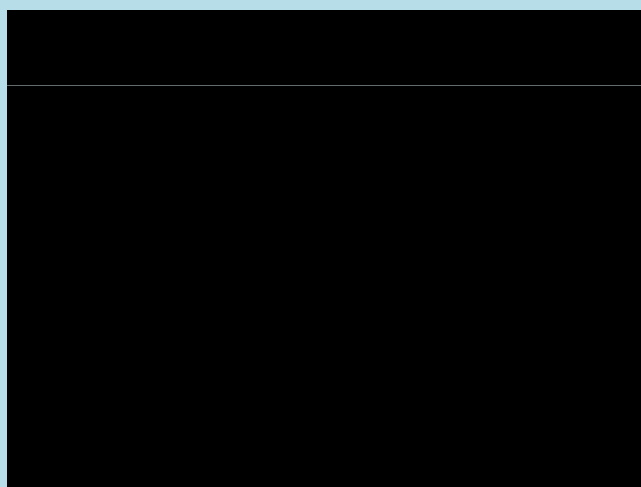
Com este trabalho ficamos a conhecer uma alternativa ao antibióticos – os fagos. Desta forma, quando os antibióticos não funcionam, podemos utilizar os fagos como método terapêutico, visto que estes apresentam numerosas vantagens sendo as principais o facto de estes não apresentam efeitos secundários nem levam à crescente resistência bacteriana (o que acontece com os antibióticos). Assim, devemos arranjar métodos que permitam seleccionar fagos que tenham elevado EOP e Host Range reduzido. E uma vez identificada a bactéria responsável por uma dada infecção podemos combatê-la naturalmente, usando o fago que lhe é específico.

4. Anexos

Procedimento e material:

<http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/2desafio/fagos.pdf>

Vídeos da realização da actividade:



Diluições

4. Bibliografia

- <http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/2desafio/fagos.pdf>
- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fago>
- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9ria>

Fim!