

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

ISOLAMENTO DE COLIFORMES: USO DIDÁTICO

**PRISCILA BELLINGIERI SÃO GREGÓRIO
DA SILVA**

Orientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

Co-orientadora: Flávia Roberta De Annunzio

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia de
Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de
Tecnólogo em Biocombustíveis**

**Jaboticabal – SP
2º Semestre/2012**

Silva, Priscila Bellingieri São Gregório da
S586i Isolamento de coliformes: uso didático / Priscila Bellingieri São Gregório da
Silva.— Jaboticabal : Fatec, 2012.
24f.

Orientador: Mariana Carina Frigieri Salaro
Coorientador: Flávia Roberta de Annunzio

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em
Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Qualidade da água. 2. *E. coli*. 3. Água contaminada. I. Salaro, M. C. F.
II. Título.

CDU 628.16.04/.09(07)

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ISOLAMENTO DE COLIFORMES: USO DIDÁTICO

AUTORA: PRISCILA BELLINGIERI SÃO GREGÓRIO DA SILVA

ORIENTADORA: PROFa. DRa. MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

CO-ORIENTADORA: FLÁVIA ROBERTA DE ANNUNZIO

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI

FLAVIA OKUSHIRO OGASSAVARA

Data da apresentação: 19 de Dezembro de 2012.

Presidente da Comissão Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por ter me dado força, sabedoria, paciência e coragem para enfrentar todas as diversidades que passei, aos meus Pais pelo incentivo, apoio e força nas horas difíceis, a minha família pela paciência que teve durante as minhas dificuldades, principalmente meu esposo Cláudio e meus filhos Lucas, João Pedro e Anna Júlia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Fatec de Jaboticabal a oportunidade que me foi oferecida;

A todos os Professores que me acompanharam ao longo dos seis semestres, pela dedicação e paciência;

Ao Professor Leonardo Lucas Madaleno, pela compreensão;

A Professora Mariana Carina Frigieri Salaro pela prontidão e dedicação;

A Flávia Roberta de Annunzio pela ajuda e disponibilidade;

A meus amigos e colegas do curso pela ajuda nas horas difíceis em especial a Soraia Pereira da Silva;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização de mais essa etapa na minha vida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 A importância da água.....	13
3.2 Indicadores da qualidade da água.....	14
4 COLIFORMES.....	16
4.1. Análise Bacteriológica da água para potabilidade.....	17
4.2. Padrão de potabilidade.....	17
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
6 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	20
7 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

EMB	Eosina azul de metileno
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
AN	Agar Nutriente
PA	Presença/Ausência
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da divisão dos coliformes. Fonte Cassini, 2011.....	16
Figura 2: Identificação dos tubos (A) e das placas (B) a serem utilizadas durante o experimento.....	20
Figura 3: Após a filtração as membranas foram dispostas nos meios de cultura AN (A) e EMB (B).....	21
Figura 4: Resultados obtidos para os tubos da amostra 2 (A). Em destaque está o tubo de caldo EC (B).....	22
Figura 5: Resultados obtidos em caldo PA para as quatro amostras (A). Em destaque a amostra 2 positiva (B).....	22
Figura 6: Resultados obtidos para a amostra 2 em meio EMB e em ágar nutriente (A). Em destaque o repasse das colônias obtidas (B).....	23

RESUMO

ISOLAMENTO DE COLIFORMES: USO DIDÁTICO

As bactérias do grupo Coliformes são usualmente utilizadas como padrões de qualidade da água. A presença desses micro-organismos pode indicar a possibilidade de ocorrência de patógenos relacionados a várias doenças, transmitidas pela água contaminada. Com o objetivo de isolar coliformes para serem utilizados como controles positivos nas aulas práticas de Microbiologia foram coletados e ensaiados amostras de água de recipientes usados por animais domésticos (cães e gatos). Quatro amostras, portanto foram testadas e apenas uma delas apresentou resultados satisfatórios, sendo, portanto selecionada para uso como controle em outros experimentos.

Palavras-chave: qualidade de água. *E. coli*. água contaminada.

ABSTRACT

ISOLAMENTO DE COLIFORMES: USO DIDÁTICO

Coliforms widely used as standards of water quality, because the presence its have indicate the possibility of occurrence from other pathogens, its related to various diseases and its, transmitted by contaminated water. In order to isolate coliforms to be used as positive control microbiology practical classes, were analyzed water samples taken from bowls used for domestic animals (dogs and cats). Four samples were tested and only one sample showed satisfactory results. This sample was selected to be used in other experiments.

Keywords: *Water quality. E. coli. contaminated water.*

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do grupo coliforme têm sido utilizadas há vários anos na avaliação da qualidade microbiológica de amostras ambientais. As bactérias pertencentes a esse grupo são definidas como bacilos gram negativos aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos, possuindo a capacidade de formar gás devido à fermentação da lactose (TORTORA *et al.*, 2006). Segundo Farias (2006), dentre as principais formas de contaminação dos recursos hídricos estão os lançamentos de esgoto sem tratamento prévio, em rios e lagos, construção de aterros sanitários que afetam os lençóis freáticos e o arraste de excrementos humanos e de animais durante períodos de chuva. Tortora *et al.*, 2006 reforça que a forma mais perigosa de contaminação ocorre quando as fezes contaminam no abastecimento de água, uma vez que muitas doenças são perpetuadas pela rota feco-oral. Devido a esse fato os coliformes fecais (chamados atualmente de termorresistentes ou termotolerantes) são os mais utilizados como padrões de qualidade da água, pois a sua presença pode indicar a possibilidade de ocorrência de outros micro-organismos patogênicos que estão relacionados a várias enfermidades, veiculadas pela água contaminada (ALESSO, 2009). O coliforme fecal predominante é a *Escherichia coli* que faz parte da população bacteriana intestinal humana (TORTORA *et al.*, 2006).

2 OBJETIVO

Com o objetivo de isolar bactérias do grupo coliformes para serem utilizadas como controles positivos das aulas práticas da disciplina de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC) foram analisadas amostras de água obtidas de recipientes utilizados por animais domésticos (cães e gatos).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A importância da água

A água cobre $\frac{3}{4}$ da superfície da Terra, e compõe também $\frac{3}{4}$ do nosso organismo. Entre todos os elementos que compõem o universo, a água é o que melhor representa a essência do homem, constituindo-se em um elemento ativo à vida. Contudo, a disponibilidade de água para o uso humano é pequena. Destaca-se que a maior parte da água disponível no planeta (97,5 %) é salgada, sendo imprópria para uso. Assim, a água doce corresponde a pouco mais de 2,5 % do volume total, e apenas uma pequena parcela (0,27 %) encontra-se disponível em rios e lagos de fácil captação (FARIAS, 2006).

Entre as características químicas mais importantes da água destaca-se o fato de ser um ótimo solvente universal com isso a água é capaz de dissolver um grande número de substâncias orgânicas ou inorgânicas nos estados sólido, líquido ou gasoso (BRAGA, *et al.*, 2005), essa propriedade faz com que ela carregue compostos dissolvidos, alguns bastante tóxicos, e ainda vírus, fungos e bactérias perigosas (FARIAS, 2006). A qualidade de vida dos seres humanos está diretamente ligada à água, pois ela é utilizada para o funcionamento adequado de seu organismo, sendo consumida diretamente ou usada no preparo de alimentos e na higiene pessoal.

Segundo Braga *et al.*,(2005) o uso da água para abastecimento doméstico deve apresentar algumas características sanitárias e toxicológicas adequadas, tais como, isentas de organismos patogênicos que são aqueles que transmitem doenças pela ingestão ou contato com água contaminada a qual não é útil para beber, lavar, irrigar ou ter uso industrial e pode conter metais tóxicos, solventes orgânicos, ácidos ou bases. A água é contaminada principalmente pela atividade humana.

Segundo Duarte (2011) as principais fontes de contaminação que alteram a qualidade das águas são diversas: esgotos domésticos, efluentes industriais, efluentes da agricultura, desmatamento, mineração, resíduos sólidos, efluentes da suinocultura, poluição difusa em áreas urbanas, salinização, acidentes ambientais, construção de barragens e aquicultura.

Como a atividade poluidora humana é contínua, muitos governos tem passado legislações para a conservação da água útil disponível. As principais leis nesse sentido

obrigam os agentes poluidores a tratar a água utilizada antes que ela seja devolvida ao rio ou lago, e são leis lógicas, pois é sempre mais fácil tratar a água antes de devolvê-la ao meio ambiente, do que despoluir um rio ou um lago (FARIAS, 2006).

A água continua a ser a principal fonte de transmissão de patógenos entéricos nos países em desenvolvimento, causando doença diarreica e colaborando diariamente para a morte de aproximadamente 4.500 crianças no mundo devido a doenças relacionadas com a falta de saneamento (DUARTE, 2011).

3.2 Indicadores da qualidade da água

Muitas vezes a água pode apresentar-se límpida, inodora e insípida e ainda ser uma água imprópria para o consumo humano, pois, muitos contaminantes presentes na água precisam de testes minuciosos para ser detectados. Segundo Pelczar *et al.*, (1997) os contaminantes que poluem a água podem interferir nas características da água em três categorias: física, química e biológica.

Nas características físicas, incluem a alteração na cor, na turbidez, no sabor e no odor. As características químicas da água podem ser modificadas devido à presença de substâncias dissolvidas geralmente mensuráveis apenas por meios analíticos: salinidade, dureza, alcalinidade, corrosividade, impurezas orgânicas, nitrogênio e cloretos, compostos tóxicos, fenóis, detergentes e agrotóxicos (BRAGA, 2005). As características biológicas da água podem ser alteradas pela presença de algas, bactérias, vírus e protozoários não naturais do meio aquático.

Na água contaminada podem ser encontrados uma grande quantidade de micro-organismos devido à presença de matéria orgânica passível de ser consumida por tais. Dentre os micro-organismos presentes os patogênicos podem acarretar em grandes riscos à saúde humana. Segundo Braga (2005) a detecção individual desses micro-organismos é dificultada pela grande variedade encontrada na água, sendo mais fácil confirmar a presença destes através de indicadores de materiais fecal no meio líquido.

Os micro-organismos indicadores ou bioindicadores evidenciam que a água pode estar poluída com material fecal de origem humana ou de outros animais de sangue quente. Este

tipo de poluição indica que qualquer micro-organismo patogênico do trato intestinal pode estar presente na água (PELCZAR, *et al.*, 1997).

Entretanto, não é prático procurar somente patogênicos, os quais, geralmente só estão presentes em pequena quantidade e provavelmente não estariam incluídos nas amostras. Além disso, a determinação individual de micro-organismos é inviável por ser muito demorada, trabalhosa e cara. Desta forma, o uso de bioindicadores torna-se imprescindível (TORTORA *et al.*, 2006). Tradicionalmente os indicadores são usados por limitações de ordem prática, técnica e econômica, uma vez que se torna impossível examinar todos os potenciais organismos patogênicos presentes na água (DUARTE, 2011).

Os testes para pureza de água utilizada atualmente, visam detectar organismos indicadores específicos. Existem vários critérios para utilizar um organismo indicador, o mais importante é que o organismo esteja consistentemente presente em números substanciais nas fezes humanas, de forma que sua detecção seja uma boa indicação que resíduos humanos estão sendo introduzidos na água (TORTORA *et al.*, 2006).

Segundo Duarte (2011) algumas características importantes de um bioindicador são:

- Estar presente em água poluída e não em água potável;
- Estar presente quando houver micro-organismos patogênicos;
- Estar presente em maior número do que os patogênicos;
- Ser facilmente evidenciado por técnicas laboratoriais padronizadas.

4 COLIFORMES

As bactérias do grupo Coliformes são as mais utilizadas como indicadores biológicos de qualidade de água.

Os coliformes são bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, na forma de bacilos Gram negativos, não formam esporos e fermentam a lactose caracterizados pela presença da enzima β -galactosidase, formando gás em temperatura no prazo de 24 horas a 44,5°C (DUARTE, 2011).

Segundo Nogueira e Filho (2010) as bactérias do grupo Coliforme fazem parte da família das Enterobactérias e podem ser divididas em:

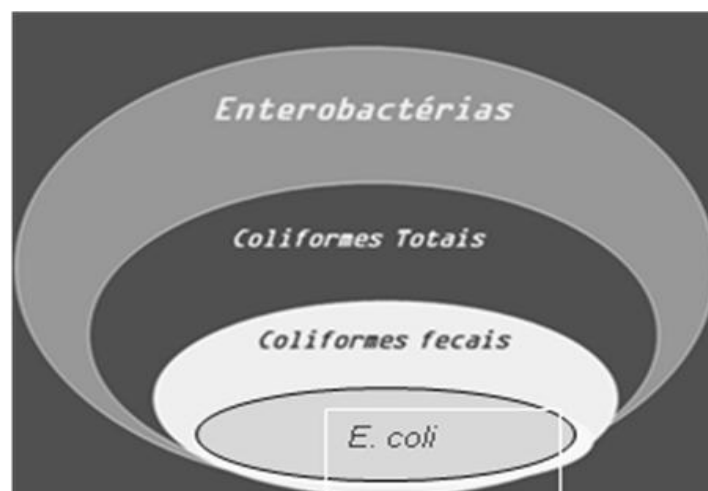
Coliformes totais: são aqueles que habitam nas águas e solos do meio ambiente e que podem também ser oriundos de fezes.

Coliformes Termotolerantes (fecais): são originados diretamente de fezes, vindos de esgotos domésticos basicamente.

Coliforme específico: *Escherichia coli* e também inclui os gêneros: Klebsiella, Enterobacter e Citrobacter.

Essa divisão pode ser mais bem compreendida na Figura 1.

FIGURA 1- Divisão dos coliformes



Fonte: Cassini (2011).

Em condições normais os coliformes não são bactérias patogênicas embora certas linhagens possam ser bastante virulentas e causar diarreia e infecção urinárias oportunistas

(TORTORA *et al.*, 2006). A *E. coli* é um habitante normal do trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente, é o Coliforme específico mais utilizado por satisfazer as exigências de um indicador ideal de poluição (PELCZAR *et al.*,1997).

4.1. Análise Bacteriológica da água para potabilidade

Os coliformes têm várias características em comum com espécies dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*, das quais todas são patogênicas. Entretanto a principal diferença bioquímica característica é que os coliformes fermentam a lactose com produção de ácido e gás; *Salmonella* e *Shigella* não fermentam a lactose. Portanto, a fermentação da lactose é a reação chave no procedimento laboratorial para determinar a potabilidade da água (PELCZAR *et al.*,1997). Desta forma, os métodos para determinar a presença de coliformes na água são baseados na habilidade das bactérias coliformes em fermentar a lactose.

Outro método bastante utilizado é o de filtração em membrana, o qual é um método mais direto na determinação da presença e dos números de coliformes (TORTORA *et al.*, 2006). Esta técnica apresenta diversos aspectos desejáveis sendo que um grande volume da amostra pode ser examinado, teoricamente, quase todo o volume de água pode ser filtrado por meio da membrana e conseqüentemente os resultados podem ser obtidos mais rapidamente (PELCZAR *et al.*,1997), nesta aplicação as bactérias coletadas na superfície de uma membrana filtrante removível são colocadas em um meio adequado e incubadas (TORTORA *et al.*, 2006) .

4.2. Padrão de potabilidade

Segundo Portaria MS nº 1.469, de 29 de dezembro 2000. Portaria do Ministério da Saúde, publicada no DO de 2 de janeiro de 2001) revogada pela Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, o Art.11da ANVISA a água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico de acordo com a Tabela 1 a seguir:

TABELA 1 Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano

PARÂMETRO	VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano⁽²⁾	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100 ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 ml
Coliformes totais	Sistemas que analisam até 40 amostras por mês: Ausência em 100 ml em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam mais de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 ml

NOTAS: (1) Valor Máximo Permitido.

(2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

5 MATERIAL E MÉTODOS

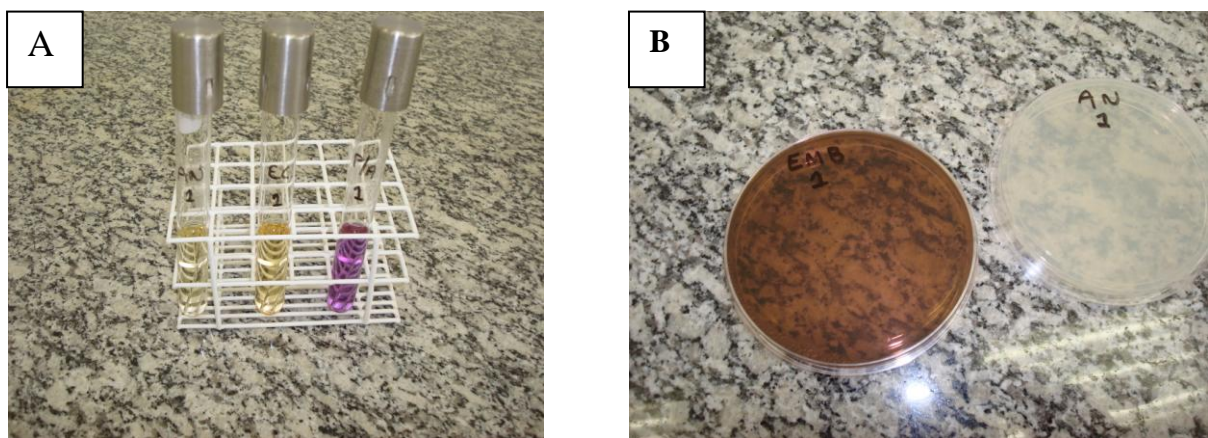
As amostras de água para análise da presença de coliformes para posterior isolamento e utilização como controle positivo das aulas práticas de microbiologia foram obtidas dos recipientes dos animais domésticos, sendo duas amostras de recipientes utilizados por cães (amostras 1 e 2) e duas de recipientes utilizados por gatos (amostras 3 e 4). Cada amostra foi submetida à análise de crescimento total, para micro-organismos em geral foram utilizados tubos de caldo nutriente e análises específicas para coliformes foram usados tubos de caldo Presença/Ausência - PA e de caldo EC. Em todos os tubos havia a presença dos tubos de Durham invertido para facilitar visualização da formação de gases. Os tubos foram inoculados com 0,1mL da amostra de água a ser testada.

Para as análises nos meios sólidos, as amostras foram diluídas (20X) colocando-se 15 ml da amostra em um frasco contendo 285 ml de água estéril. Foi, então, realizada uma filtração em um sistema a vácuo e 100 ml (2 vezes) das amostras de água utilizando membranas filtrantes estéreis em nitrato de celulose com porosidade de 0,22 µm. Realizada a filtração, as membranas foram colocadas sobre os meios de cultura nas placas de AN (ágar nutriente), para avaliação de crescimento geral e em placas de EMB (eosina azul de metileno) para crescimento específico, com o auxílio de uma pinça estéril, após a filtração de cada amostra o sistema de filtração foi lavado com detergente, álcool e água destilada. As placas e os tubos foram incubados 48 horas à 35°C.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

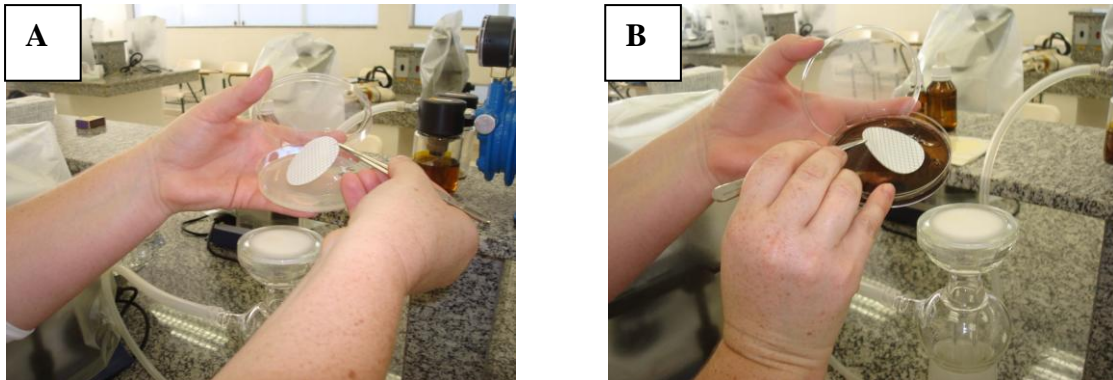
As amostras obtidas foram submetidas às análises microbiológicas para a identificação da presença de bactérias do grupo coliformes. A Figura 2 apresenta os tubos e placas utilizados para a análise de cada amostra.

FIGURA 2: Identificação dos tubos (A) e das placas (B) a serem utilizadas durante o experimento.



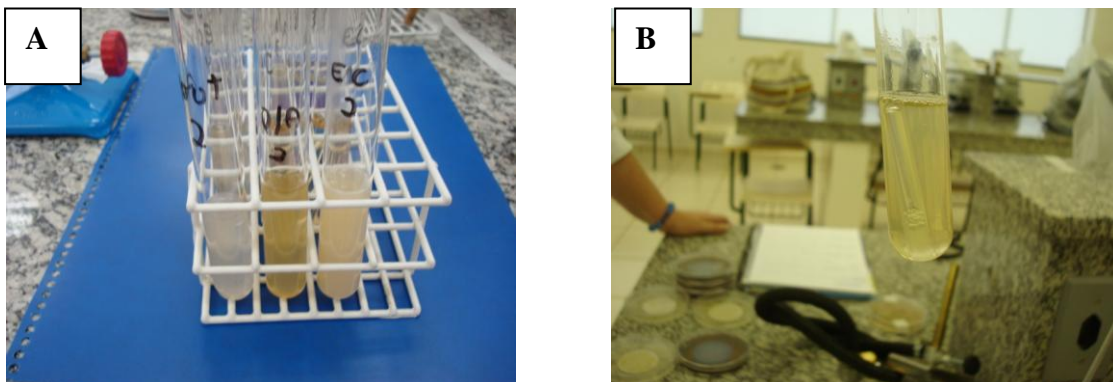
As amostras foram adicionadas em tubos contendo caldo nutriente, o qual é um meio de cultura básico para a manutenção de micro-organismos em geral. Esse meio foi utilizado com a finalidade de ser um controle positivo do experimento. Como controle negativo foram utilizados os meios de cultura sem inoculação. As amostras também foram adicionadas em meios que favorecem o crescimento e a detecção de bactérias do grupo coliformes (caldo EC e caldo PA), por possuírem lactose na sua composição. A seguir, as amostras foram diluídas (20X) e submetidas ao processo de filtração utilizando membranas estéreis. Após a filtração as membranas foram dispostas em meios sólidos AN e EMB como mostrado na Figura 3. O meio AN é utilizado como controle de crescimento como já referido para o caldo AN. O meio EMB contém os corantes eosina e azul-de-metileno que inibe as bactérias gram-positivas num determinado grau. Esses corantes funcionam também como indicadores de diferenciação em resposta à fermentação da lactose por micro-organismos. Os coliformes produzem colônias preto-azuladas, enquanto as colônias de *Salmonella* e *Shigella* são incolores ou têm uma cor âmbar transparente. As colônias de *Escherichia coli* podem apresentar um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (BD, 2011).

FIGURA 3: Após a filtração as membranas foram dispostas nos meios de cultura AN (A) e EMB (B).



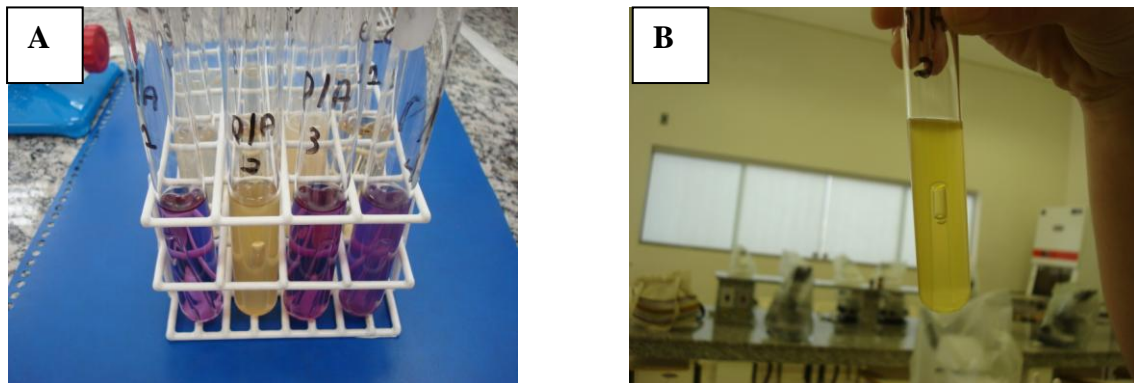
Das quatro amostras testadas apenas a amostra 2 apresentou resultado satisfatório. A Figura 4 apresenta os resultados obtidos para a amostra 2 (A). É possível observar o crescimento no caldo nutriente sem a formação de gás. No caldo PA e no caldo EC houve crescimento com a formação de gás. A mesma Figura destaca a formação de gás no caldo EC (B).

FIGURA 4: Resultados obtidos para os tubos da amostra 2 (A). Em destaque está o tubo de caldo EC (B).



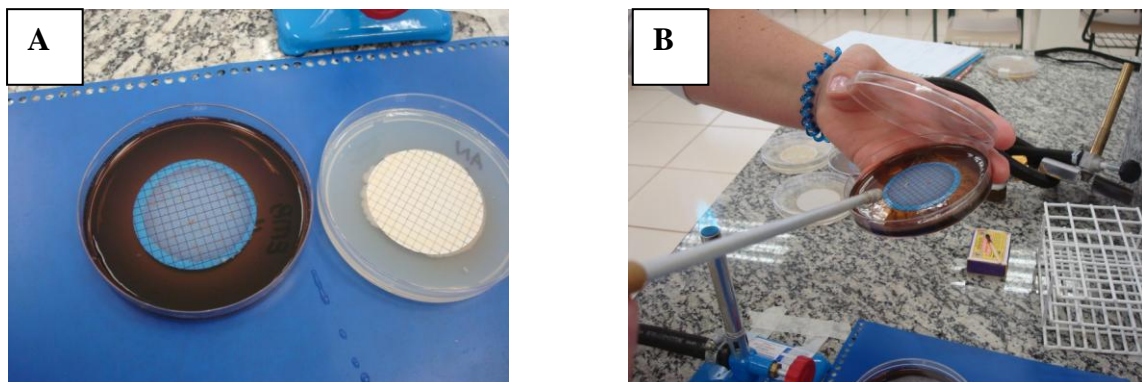
No caldo PA além da formação de gás houve a acidificação do meio, evidenciado pela mudança de sua coloração de púrpura para amarelo, indicando a presença de bactérias do grupo coliformes. A Figura 5 mostra os resultados obtidos para as 4 amostras no meio PA (A). É possível verificar que somente na amostra 2 houve alteração da coloração com formação de gás (B)

FIGURA 5: Resultados obtidos em caldo PA para as quatro amostras (A). Em destaque a amostra 2 positiva (B).



A Figura 6 mostra os resultados obtidos para a amostra 2 no ágar nutriente e no ágar EMB (A). Não foi possível obter colônias típicas de *E.coli* (verdes com brilho metálico). Mesmo assim, as colônias foram repassadas (B) para serem utilizadas posteriormente como controle positivo nas aulas práticas.

FIGURA 6: Resultados obtidos para a amostra 2 em meio EMB e em ágar nutriente (A). Em destaque o repasse das colônias obtidas (B).



7 CONCLUSÃO

Das quatro amostras de água testadas apenas uma foi positiva para bactérias do grupo coliformes. Essas bactérias foram selecionadas e submetidas a novos cultivos com o objetivo de manutenção para que possam ser utilizadas como controle positivo nas aulas práticas envolvendo análise de água.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, C.E. PINTO, G. S. MOURA, A. C. **Avaliação Microbiológica das Águas das Principais Fontes de Praças e Parques de Cascavel** – PR., Ciênc. Biol. Saúde. 2009; 11(2): 41- 4.

ANVISA. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Portaria MS nº 1.469, de 29 de dezembro. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm > Acesso em 20/09/12

BD. **Instruções de utilização – meios em placas prontos a usar**. 2011. Disponível em < <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9068> > Acesso em 19 de agosto de 2012.

BRAGA, B. HESPANHOL, I. CONEJO, J G.L.MIERZWA, J. C. BARROS, M.T.L. SPENCER, M. PORTO, M. NUCCI, N. JULIANO, N. EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental** – 2. ed. O desafio do desenvolvimento sustentável. São Paulo, 2005. 332p.

CASSINI, S. T. **Avaliação de Bioindicadores de Qualidade de águas**. Programa de pós-graduação em gestão ambiental-UFES-Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-Espírito Santo, 2011. Disponível em < www.inf.ufes.br/~neyval/Gestao.../aula_5_bioind_agua.ppt > Acesso em 05/09/12.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Monitoramento de Escherichia coli e coliformes termotolerantes em pontos da rede de avaliação da qualidade de águas interiores do Estado de São Paulo**, 2008 Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/publicacoes/relatorios/2008ecoli.pdf> > Acesso em: 25 de julho de 2012.

DUARTE, P.B. **Microorganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

FARIAS, M. S. S. **Monitoramento da qualidade da água na bacia hidrográfica do rio cabelo**. Universidade federal de campina grande. Centro de tecnologia e recursos naturais campina grande estado da Paraíba, 2006.

HARVEY, R. A. CHAMPE, P. C. FISHER, D.B. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed.- Porto Alegre: Arned, 2008.

NOGUEIRA, A. V. FILHO, G.N.S. **Microbiologia**. Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2010. 213p.

PELCZAR, Jr. CHAN, E.C.S. KRIEG, N. R.. EDWARDS; D.D. PELCZAR, M. F. **Microbiologia conceito e aplicações**. 2ª ed.- Volume 2, 1997

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, 2006.