

APARECIDA SÔNIA DE SOUZA é Doutora e Mestre em Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Especialista em Saúde Pública pela Secretaria da Saúde de São Paulo e Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa. Possui experiência profissional na Indústria de Alimentos, na área de controle de qualidade de produtos cárneos e em Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos. Atualmente é Assistente à Pesquisa do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas, SP e, desenvolve pesquisa na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Nutrição Aplicada à Tecnologia de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: hidrolisados protéicos, hidrólise enzimática, isolado protéico de soja, peptídeos e irradiação gama e funcionalidade de alimentos.



Autoras: Edilsa Rosa da Silva e
Aparecida Sônia de Souza

Apresentação da obra

A Microbiologia é um ramo da Ciência Biológica responsável por estudar e caracterizar o mundo microbiano. A disciplina Microbiologia pretende introduzir o aluno nos fundamentos dessa ciência, além de familiarizá-lo e treiná-lo na manipulação dos microrganismos. Esta obra apresenta duas etapas: uma composta por textos, que relatam a importância da Microbiologia, o seu avanço e as contribuições marcantes na área nos últimos séculos, uma breve caracterização dos dois principais grupos microbianos (bactérias e fungos) e, em uma segunda etapa, uma descrição de aulas práticas básicas de Microbiologia para reforçar o processo de aprendizagem dos alunos e, ao mesmo tempo, de formato bastante simples, facilitando o preparo de materiais e a adequação às condições laboratoriais disponíveis, na maioria das vezes, com limitações importantes.

ISBN 978-85-64124-22-6



9 788564 124226



Ministério da
Educação



EDITORA
B

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA MICROBIOLOGIA:
TEORIA E PRÁTICA

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA MICROBIOLOGIA: TEORIA E PRÁTICA

Edilsa Rosa da Silva
Aparecida Sônia de Souza



O presente trabalho tem como objetivo disponibilizar aos estudantes de cursos técnicos e superiores dos Institutos Federais que têm, em sua grade curricular, componentes curriculares relacionados à Microbiologia, um material introdutório ao estudo dessa ciência, visando contribuir para a aquisição de conhecimentos teóricos e práticos básicos nessa área.

EDILSA ROSA DA SILVA é Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, Mestre em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas e Graduada em Economia Doméstica pela Universidade Federal de Viçosa. Possui experiência profissional, em Instituições de Ensino e Pesquisa, como a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Instituto Paulista de Educação e Universidade Estadual de Campinas, principalmente na área de ensino do cultivo e manipulação de microrganismos em Laboratórios de Microbiologia. Atualmente é docente no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, atuando também como pesquisadora na área de Microbiologia Básica e Aplicada ao controle de qualidade higiênico-sanitária de alimentos, biodegradação de resíduos lignocelulósicos, monitoramento microbiológico sistemas de tratamento biológico de resíduos e isolamento de bactérias e fungos de amostras ambientais.

Introdução ao Estudo da Microbiologia: Teoria e Prática

**Edilsa Rosa da Silva
Aparecida Sônia de Souza**

**EDITORA IFB
Brasília-DF
2013**



REITOR

Wilson Conciani

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

Luciana Miyoko Massukado

PRÓ-REITORIA DE ENSINO

Adilson Cesar de Araujo

PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

Giano Luiz Copetti

PRÓ-REITORIA DE DESENVOLVIMENTO INSTITUCIONAL

Rosane Cavalcante de Souza

PRÓ-REITORIA DE ADMINISTRAÇÃO

Simone Cardoso dos Santos Penteadó

Introdução ao Estudo da Microbiologia: Teoria e Prática

Edilsa Rosa da Silva
Aparecida Sônia de Souza

EDITORA IFB
Brasília-DF
2013

© 2013 EDITORA IFB

Todos os direitos desta edição reservados à Editora IFB.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora do IFB.



SGAN 610, Módulos D, E, F e G
CEP 70860-100 - Brasília -DF
Fone: +55 (61) 2103-2108
www.ifb.edu.br
E-mail: editora@ifb.edu.br

Conselho Editorial

Carlos Cristiano Oliveira de Faria Almeida
Cristiane Herres Terraza
Francisco Nunes dos Reis Júnior
Gabriel Andrade Lima de Almeida
Gustavo Abílio Galeno Arnt
Juliana Rocha de Faria Silva
Katia Guimarães Sousa Palomo
Luciano Pereira da Silva

Luiz Diogo de Vasconcelos Junior
Marco Antonio Vezzani
Reinaldo de Jesus da Costa Farias
Renato Simões Moreira
Richard Wilson Borrozine de Siqueira
Tatiana de Macedo Soares Rotolo
Vanessa de Assis Araujo
Vinicius Machado dos Santos

Coordenação de Publicações

Juliana Rocha de Faria Silva

Produção executiva

Sandra Maria Branchine

Tiragem

1.000 exemplares

ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária
Lara Batista Botelho CRB - 2434

S586i Silva, Edilsa Rosa da

Introdução ao estudo da microbiologia: teoria e prática/ Edilsa Rosa da
Silva, Aparecida Sônia de Souza. _ Brasília : Editora do IFB, 2013.
66 p. : il. ; 23 cm.

ISBN 978-85-64124-22-6

1. Microbiologia. 2. Microorganismos. 3. Fungos. 4. Bactérias. 5. Biossegurança.
I. Souza, Aparecida Sônia de. II. Título.

CDU 579

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não tem a pretensão de ser completo, mas objetiva fornecer informações básicas de Microbiologia para os estudantes de cursos técnicos e superior, em seu primeiro contato com essa ciência. Por isso, primeiramente agradecemos aos nossos alunos que, ao longo do tempo, nos motivaram a desenvolver este trabalho, com seus comentários, dúvidas e sugestões.

Os temas desenvolvidos neste manual, no decorrer desses anos, receberam a contribuição de pessoas iluminadas ligadas à área de Microbiologia e afins. Somos profundamente gratas a essas pessoas.

Agradecemos especialmente aos professores Maria Cristina Dantas Vanetti, da Universidade Federal de Viçosa, e Lúcia Regina Durrant, Hélia Harumi Sato, Glaucia Maria Pastore e Yong Kun Park, da Universidade Estadual de Campinas.

Agradecimentos muito especiais a Maria Helena Martini, do Instituto Adolfo Lutz, Campinas, pela partilha, apoio e ensinamentos.

Especiais agradecimentos a todos os professores e servidores técnicos do Departamento de Química e Biologia e do Departamento de Física da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela colaboração, partilha, apoio e ensinamentos. Especial agradecimento a professora Marlene Soares pelos ensinamentos e valiosa contribuição.

Agradecemos muitíssimo a colaboração, apoio e companhia dos professores e técnicos do Núcleo da Agroindústria, Agropecuária e Agroecologia do Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina.

Agradecemos também à Editora do IFB pelo incentivo e oportunidade de realizar a publicação deste material didático.

Finalmente, gostaríamos de agradecer aos nossos familiares, amigos e ao Senhor Deus pela companhia e amor incondicional.

APRESENTAÇÃO

O estudo da Microbiologia torna o aluno consciente e capaz de reconhecer os organismos que fazem parte do mundo microbiano.

Os principais microrganismos estudados pela Microbiologia são as bactérias, os fungos, as algas microscópicas, os protozoários e os vírus. Além desses grupos, a Microbiologia pode abordar também o estudo de alguns parasitas e vermes, como o grupo dos helmintos.

Os microrganismos estão presentes em todos os aspectos da vida humana. Desde o início de nossa vida pós-uterina, a colonização do corpo humano por determinados grupos microbianos (principalmente bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e fungos e leveduras dos gêneros *Cândida* e *Pityrosporium*).

Muitos microrganismos, normalmente inofensivos vivem na superfície e no interior do corpo humano. O grupo de microrganismos que vivem normalmente no corpo humano, sem produzir sintomas característicos de uma doença é denominado de microbiota normal ou flora normal do corpo humano. Alguns microrganismos são chamados de microbiota transitória, pois não residem permanentemente, podem ficar no corpo por dias, semanas ou meses, mas tendem a desaparecer.

Alguns dos microrganismos que habitam o corpo humano são denominados patógenos oportunistas, porque normalmente não causam doenças em uma pessoa saudável, entretanto, em condições ambientais diferentes, como baixa imunidade do hospedeiro, o patógeno pode se desenvolver além do normal e causar os sintomas de uma doença característica.

A maioria dos microrganismos desempenha um papel fundamental no equilíbrio da vida no nosso planeta: constituem a base da cadeia alimentar nos ambientes marinhos, os microrganismos do solo auxiliam na decomposição

da matéria orgânica e na reciclagem de elementos essenciais para a vida, como no ciclo do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo entre outros.

Ao longo dos anos, a Microbiologia desenvolveu pesquisas básicas e aplicadas voltadas para o estudo do potencial biotecnológico dos microrganismos. Esses estudos mostraram uma vasta capacidade de aplicação destes organismos: produção microbiana de ácidos orgânicos, enzimas, ésteres, álcoois, antibióticos e muitas outras substâncias; desenvolvimento de muitos alimentos a partir do cultivo de microrganismos sobre diferentes substratos; utilização de microrganismos no tratamento de resíduos líquidos e sólidos, biorremediação de ambientes contaminados por substâncias tóxicas e recalcitrantes são alguns dos benefícios que estes organismos trazem para o nosso dia-dia.

O conhecimento sobre o mundo microbiano deve considerar também uma pequena parcela de microrganismos, denominados patogênicos, que são aqueles organismos capazes de provocar uma doença com sintomas característicos. Ao longo dos séculos, milhares de pessoas morreram por causas de epidemias causadas por microrganismos desconhecidos na época, ou por falta de vacinas e antibióticos ainda não disponíveis para combater as enfermidades.

A elevada capacidade de biodegradação de alguns microrganismos, também apresenta aspectos negativos, quando provoca a deterioração de alimentos e outros materiais utilizados pelos seres humanos, provocando grandes perdas e prejuízos sócio-econômicos.

Finalmente, devemos considerar que os microrganismos estão presentes em todos os ambientes habitados ou não por outros organismos e que todo conhecimento a respeito desses seres vivos, nos tornará mais capacitados e eficientes no estabelecimento de uma relação equilibrada e saudável com os mesmos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
APRESENTAÇÃO.....	7

PARTE 1

INTRODUÇÃO À MICROBIOLOGIA

O MUNDO DOS MICRORGANISMOS.....	13
AS FERRAMENTAS DA MICROBIOLOGIA.....	18
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS.....	21
BACTÉRIAS.....	22
FUNGOS.....	25

PARTE 2

INTRODUÇÃO A MICROBIOLOGIA PRÁTICA

SEGURANÇA EM MICROBIOLOGIA.....	33
NORMAS BÁSICAS DE BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIO.....	34
CONTROLE DE MICRORGANISMOS.....	36
AULA PRÁTICA 1 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TOTAIS PRESENTES NAS DIGITAIS DAS MÃOS	38
AULA PRÁTICA 2 - ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS A PARTIR DE AMOSTRA AMBIENTAL OU DE ALIMENTOS	40

AULA PRÁTICA 3- MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES	43
AULA PRÁTICA 4 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS	47
AULA PRÁTICA 5 - TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA COLORAÇÃO	53
REFERÊNCIAS	59
ANEXO 1 MICROSCOPIA DE BACTÉRIAS.....	61
ANEXO 2 MICROSCOPIA DE FUNGOS.....	63

PARTE 1
Introdução à
Microbiologia

O MUNDO DOS MICRORGANISMOS

Afinal, o que é Microbiologia?

Quais são as áreas de abrangência?

Qual é a importância no seu curso?

- A Microbiologia é uma ciência derivada da Biologia que vem se desenvolvendo nos últimos séculos devido a contribuição de inúmeros personagens, profissionais, estudiosos ou simplesmente pessoas curiosas e dedicadas a conhecer um mundo aparentemente invisível. O principal objetivo da Microbiologia é estudar todos os aspectos que envolvem o mundo microbiano, constituído pelas bactérias, fungos (filamentosos, “bolores”, “mofos” e leveduras), protozoários, vírus e algas microscópicas.
- Ao longo da evolução humana, ficou cada vez mais claro o papel desempenhado pelos microrganismos no estabelecimento dos seres vivos no planeta Terra: são responsáveis por alterações climáticas que possibilitaram o desenvolvimento de formas de vidas mais complexas e diversas. Além disso, sabe-se que os microrganismos são os grandes recicladores de matéria orgânica, sendo responsáveis pela ciclagem de elementos vitais para os seres vivos, como o N, S, P, Fe, entre outros.
- Com o desenvolvimento da Microbiologia, ficou estabelecido que aproximadamente 99% dos microrganismos desempenham um papel benéfico ou inócuo para a vida dos seres vivos no planeta, entretanto, em torno de 1% são considerados patogênicos ou com potencial para provocar as mais diversas doenças. Para a história humana, isso representou a morte de milhões de pessoas ao longo dos séculos devido a doenças provocadas por Microrganismos, como a peste negra, febres tifóides, gripe espanhola, cólera, síndrome HIV, toxiiinfecções diversas e generalizadas, entre outros.
- Devido ao fato de Microbiologia se dedicar ao estudo de microrganismos que ocupam os mais diferentes ambientes, desenvolvendo as mais diversas atividades, essa tornou-se uma ciência com atuação em muitas áreas:

- Microbiologia Ambiental;
 - Microbiologia de Alimentos;
 - Microbiologia Veterinária;
 - Microbiologia Agrícola;
 - Microbiologia Médica e Sanitária;
 - Microbiologia Industrial;
 - Fisiologia e Genética Microbianas;
 - entre outros.
- A disciplina **Microbiologia** deve fornecer informações e instrumentos pertinentes para o estudante, contribuindo, assim, com a sua formação técnica. Deve indicar os microrganismos que desempenham papel fundamental no meio ambiente, na produção e na deterioração de alimentos, entre outras aplicações, as formas de controlá-los, além de caracterizar o potencial dos microrganismos em todos os aspectos da vida humana.
 - Qual a importância e aplicação do estudo dos microrganismos no seu curso?

HISTÓRIA DA Microbiologia, ALGUNS MARCOS:

1686 – Anton Van Leeuwenhoek: artesão e comerciante holandês descreveu organismos microscópicos, presentes nos mais diferentes materiais (água da chuva, saliva, placa microbiana dos dentes, alimentos) com grandes detalhes. Usou lentes com aumento de até 300x. Encaminhava os seus registros para a Sociedade Real de Londres.

- **Teoria da Geração Espontânea ou Abiogênese:**

Foi aceita até a 2ª metade do século XIX. Isso representou grande entrave para o desenvolvimento e reconhecimento da Microbiologia como ciência.

1858 – Rudolf Virchow, Louis Pasteur e John Tyndall, e outros estudiosos europeus desenvolveram experimentos que finalmente terminaram com os debates sobre geração espontânea.

■ **Desenvolvimento da teoria de doenças causadas por microrganismos:**

Experimentos realizados por Pasteur e outros estudiosos, no século XIX, resultaram em muitos avanços para a Microbiologia:

1. o conceito de que a vida deveria surgir de vida pré-existente (Biogênese);
2. as técnicas de esterilização (Tyndall–tindalização, esterilização fracionada) e pasteurização (Pasteur, 63° C/30min);
3. o conhecimento do processo biológico da fermentação (Pasteur);
4. o desenvolvimento da teoria das doenças causadas por germes (Pasteur e Robert Koch) e;
5. o desenvolvimento de vacinas a partir do bacilo do carbúnculo (*Bacillus anthracis*) morto e do vírus da raiva (Pasteur) atenuado ou enfraquecido.
6. o desenvolvimento dos métodos de isolamento de microrganismos e cultivo na forma de cultura pura em meio nutritivo (Pasteur, Koch, Julius Petri e Frau Hesse);
7. o estabelecimento de um procedimento científico para provar a teoria das doenças causadas por germes, conhecido como postulados de Koch:
 - o mesmo patógeno deve estar presente em todos os casos da doença;
 - o patógeno deve ser isolado do hospedeiro doente e crescer em cultura pura;
 - o patógeno da cultura pura deve causar a doença quando inoculado em um animal de laboratório saudável e susceptível;

- o patógeno deve ser isolado do animal inoculado e é preciso demonstrar que ele é o organismo original;
- os postulados de Koch apresentam algumas exceções. **Quais seriam elas?**

■ **Algumas outras contribuições para a Microbiologia:**

- 1796 – Edward Jenner, médico britânico, iniciou um experimento com ordenhadeiras de vacas para encontrar uma maneira de proteger as pessoas da varíola, processo que ficou conhecido como vacinação;
- 1835 – Agostino Bassi, microscopista amador, provou que uma doença do bicho da seda era provocada por fungos;
- 1840 – O médico húngaro Ignaz Semmelweis alertava que médicos que não desinfetavam as mãos, costumeiramente transmitiam infecções de uma paciente para outra;
- 1860 – Joseph Lister, cirurgião inglês, aplicou a teoria do germe para procedimentos médicos e começou a indicar o uso de fenol (ácido carbólico) em solução para tratar ferimentos cirúrgicos, o que reduziu drasticamente as infecções e mortes no ambiente hospitalar;
- 1865 – Pasteur, descobriu uma outra doença do bicho da seda provocada por um protozoário e desenvolveu um método de identificação das larvas do bicho da seda contaminadas;
- 1866 – Ernst Haeckel, classificou os seres vivos em animais, vegetais e protistas (seres unicelulares);
- 1882-1883 – Robert Koch descobriu o causador da tuberculose, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e isolou o *Vibrio cholerae* de pacientes com cólera;
- 1892 – Sergei Winogradsky isolou e estudou as bactérias do ciclo do enxofre;
- 1910 – Carlos Chagas, médico brasileiro, isolou e caracterizou o protozoário *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de chagas;

- 1928 – Alexander Fleming e colaboradores (Chain e Florey) descobriram e produziram o antibiótico penicilina, sintetizado pelo fungo *Penicillium notatum*;
 - 1969 – Robert Whittaker criou o sistema de cinco reinos (**plantae, animalia, protista, fungi e monera** para as bactérias), com base em análises da morfologia da célula e na forma de nutrição dos seres vivos;
 - 1978 – Carl Woese e colaboradores, com base na análise do RNA ribossomal de diferentes células, propuseram o estabelecimento da classificação dos seres vivos em três domínios: **Eucaria, Eubacteria e Archaea** (também denominada até recentemente de arqueobactérias).
- **Existem muitos outros estudiosos que ao longo dos anos e até hoje, desenvolvem pesquisas e trabalhos que contribuem para o desenvolvimento contínuo da Microbiologia como ciência. Você deve pesquisar e ler mais sobre isso!**
- **Teoria endossimbiótica explicando a evolução das células eucarióticas:**

A Teoria endossimbiótica foi popularizada por Lynn Margulis em seu livro *Symbiosis in Cell Evolution* (BLACK, 2002; PELCZAR et al., 1996).

Segundo essa teoria, células bacterianas maiores perderam a sua parede celular e engoliram células bacterianas menores, caracterizando uma relação de endossimbiose.

O eucarioto ancestral desenvolveu um núcleo rudimentar quando a membrana plasmática se dobrou em volta do cromossomo e essa célula provavelmente ingeriu bactérias aeróbias ou bactérias fotossintéticas, que recebia nutrientes e em troca produzia energia (mitocôndrias e cloroplastos).

Os flagelos e os cílios eucariotos provavelmente se originaram de associações simbióticas entre a membrana plasmática dos primeiros eucariotos e bactérias espirais, chamadas de espiroquetas.

AS FERRAMENTAS DA Microbiologia

■ Microscopia ótica

Como o estudo da Microbiologia tem como alvo os organismos extremamente reduzidos, que só podem ser visualizados com auxílio de lentes potentes, o avanço dessa ciência esteve sempre associado ao desenvolvimento de melhores microscópicos, que permitiriam uma observação mais detalhada desses minúsculos organismos.

Os microrganismos e seus componentes estruturais são extremamente pequenos e medidos através do sistema métrico. A unidade padrão do sistema métrico é o metro (m). As unidades usadas para microrganismos são o micrômetro (μm) e o nanômetro (nm). (Tabela 1)

Tabela 1. Equivalência entre os números e as unidades métricas de medidas.

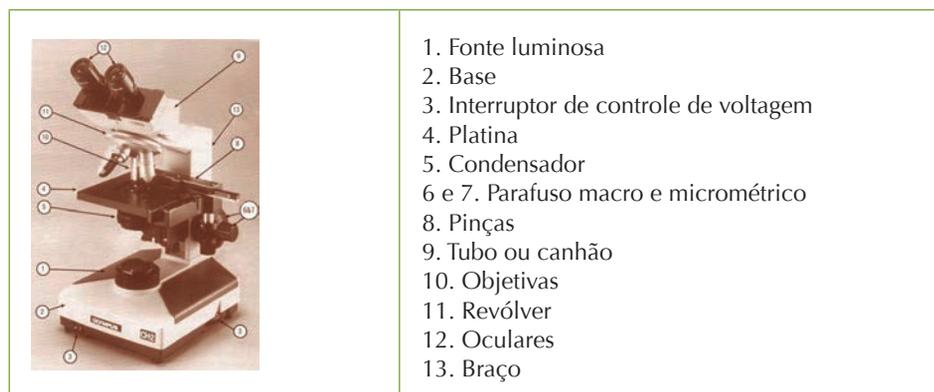
	centímetros	milímetros	micrômetros	nanômetros
Um metro contém	100	1.000	1.000.000	1.000.000.000
Um centímetro contém	1	10	10.000	10.000.000
Um milímetro contém		1	1.000	1.000.000
Um micrometro contém			1	1.000
Um nanômetro contém				1

Fonte: Burton e Engelkirk, 1998.

A microscopia óptica (campo claro) se refere ao uso de qualquer tipo de microscópio (Figura 1) que use luz para observar amostras.

■ Microscópio Óptico

Figura 01. Microscópio óptico composto. (figura disponível no Manual de Instruções do Microscópio Olympus).



O microscópio óptico, comumente chamado composto, apresenta dois sistemas de lentes para a ampliação da imagem: **a lente da ocular e a lente da objetiva.**

A ampliação total do microscópio é produto das ampliações por cada sistema de lentes individualmente e esse amplia o objeto até certo limite (1000 a 1600X).

Tal limitação é devido ao poder de resolução do sistema óptico, que é numericamente a menor distância com a qual dois pontos podem ser vistos separadamente. Ademais representa a capacidade das lentes de diferenciar detalhes finos e estruturas.

O poder de resolução do olho humano é de aproximadamente 0,2 mm. O **poder de resolução** de um microscópio composto é de aproximadamente 0,2 mm, quando usada a lente de imersão na máxima abertura numérica.

Poder de resolução (PR) é a medida do menor objeto que pode ser visto ao microscópio. É função do comprimento de onda luminosa (λ) e da abertura numérica (AN) da objetiva:

$$PR = \lambda / AN$$

A Tabela 2 registra as principais características das objetivas de um microscópio óptico.

Para se obter uma imagem clara e detalhada em um microscópio óptico, as amostras devem ter um alto contraste com o seu meio (a substância pela qual a luz passa). Para isso é diferenciado o **índice de refração** (medida da capacidade de curvatura da luz do meio) das amostras. Uma forma de diferenciar ou alterar esse índice é corar o material a ser visualizado.

Os raios de luz no microscópio óptico que percorrerão a amostra e o meio a serem analisados não devem ser perdidos. Para preservar a direção desses raios na pequena objetiva de maior ampliação, é colocado óleo de imersão entre a lâmina de vidro e a lente objetiva (100x, de imersão). O óleo de imersão tem o mesmo índice de refração que o vidro e, assim, torna-se parte da óptica do vidro do microscópio. O óleo tem o mesmo efeito que o aumento do diâmetro da objetiva, melhorando a potência de resolução das lentes.

Tabela 2: Principais características das objetivas do microscópio óptico
Fonte: Soares et al. (1986).

	Ampliação linear da objetiva		
Características	10X ³	40-45X ⁴	90-100X ⁵
Distância focal aproximada (mm) ¹	16	4	1,8
Diâmetro aproximado do campo (mm)	1,5	0,34	0,15
Abertura numérica	0,25	0,65	1,25

Distância da operação aproximada (mm) ²	4,50	0,65	0,13
Poder de resolução ($\lambda=500\text{nm}$) (μm)	2,0	0,7	0,4
Máxima ampliação aproximada obtida com a ocular 10X	100X	450X	1000X

¹ – Distância focal é a distância do centro da lente da objetiva ao foco, dada em mm.

² – Distância da operação é a distância entre a parte externa da lente da objetiva e o objeto, quando em foco, dada em mm.

³ – A objetiva de ampliação linear 10X é denominada objetiva a seco de pequeno aumento.

⁴ – A objetiva de ampliação linear 40-45X é denominada objetiva a seco de grande aumento.

⁵ – A objetiva de ampliação linear 100X é denominada de imersão.

Outros microscópios ópticos são construídos e ajustados para técnicas em **campo escuro, microscópio de fase contraste e microscópio de fluorescência**.

Outros tipos de microscopia são representados pelos **microscópios eletrônicos**, que usam feixes de elétrons como fonte de iluminação em vez de luz visível e também usam magnetos no lugar de lentes para focar o feixe. São utilizados dois tipos: **microscopia eletrônico de transmissão** (excelente resolução, aumento médio de até 200.000X) e **microscopia eletrônica de varredura** (aumento médio de 10.000X).

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS

Ao iniciar o processo de aprendizagem na Microbiologia, o estudante é levado a conhecer primeiramente dois grupos microbianos básicos: as bactérias (constituídas por células procariotas) e os fungos (constituídos por células eucariotas). Posteriormente, ele é orientado a conhecer também os protozoários (célula eucariota), as algas microscópicas (célula eucariota) e os vírus (parasitas intracelulares obrigatórios, considerados seres acelulares).

BACTÉRIAS

As bactérias são constituídas por células procariotas (Figura 2), consideradas um tipo de célula morfologicamente simples, mas com metabolismo (conjunto de reações que ocorrem no interior das células) tão versátil e complexo como uma célula eucariota. As bactérias são heterotróficas e autotróficas (cianobactérias).

Figura 2. Esquema de uma célula procariota.

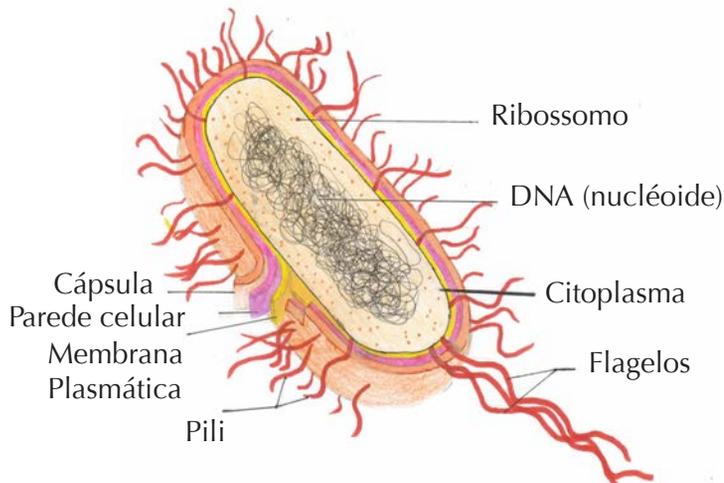


Ilustração: Érica Gabriela B. Santos (Graduada do curso superior de Tecnologia e Agroecologia / IFB - Campus Planaltina)

As bactérias podem ser agrupadas em dois domínios: eubactérias (bactérias típicas, cianobactérias e actinomicetos) e arqueas. Na classificação dos seres vivos em domínios, segundo Woese e colaboradores (1977), e segundo os reinos de classificação dos seres vivos de Whittaker, de 1969, as bactérias fazem parte do reino monera.

As bactérias podem ser encontradas fazendo parte da microbiota do corpo humano, vivendo em diferentes ambientes, como solo, ambientes aquáticos, atmosferas, alimentos e amostras ambientais diversas.

- **Você deve fazer uma pesquisa nos livros de Microbiologia Básica e páginas confiáveis da Internet e identificar as bactérias nos ambientes citados anteriormente.**
- **Você também deve fazer uma pesquisa sobre a classificação dos seres vivos segundo Whitaker (reinos) e Woese (domínios).**

As formas mais comuns de uma célula bacteriana são: esférica (coco), bastonete (bacilo), bastonete curvo (vibrião), espiral (espirilo e espiroqueta). Entretanto, as células bacterianas podem assumir diferentes arranjos, como diplo (quando se apresentam aos pares), estrepto (quando se apresentam em forma de cadeia), tétrades (quando se apresentam em grupos de quatro) e estafilo (quando se apresentam formando cachos).

- **Após uma pesquisa, faça um desenho intitulado “as formas básicas de uma célula bacteriana e seus principais arranjos”.**
- **Você também deve fazer uma pesquisa sobre o processo de esporulação das bactérias.**

A maioria das bactérias se reproduz assexuadamente por um processo chamado de **fissão binária transversa**, ou **divisão binária** ou **cissiparidade**. É um tipo de reprodução em que, a partir de uma célula mãe, são originadas duas células filhas idênticas. Porém, uma bactéria pode receber ou trocar material genético diverso com outras bactérias, desde que ocorra uma compatibilidade entre elas, através de alguns processos denominados, **conjugação** (consiste na passagem ou troca de material genético entre duas bactérias através de fímbricas ou pili sexual localizados na superfície da célula), **transformação** (a bactéria absorve moléculas de DNA disperso no meio onde se encontra) e **transdução** (as moléculas de DNA são transferidas de uma bactéria a outra usando vírus como vetores).

O crescimento bacteriano pode ser caracterizado estabelecendo uma curva de crescimento típica em laboratório de Microbiologia. O crescimento bacteriano apresenta quatro fases principais: **fase lag** (repouso), **fase log ou de crescimento intenso**, **fase estacionária** e **fase de declínio ou morte**.

A fase lag também chamada de fase de pseudo repouso, pois não é verificado aumento da população bacteriana. Contudo, é possível detectar intensa atividade metabólica no interior da célula, com duplicação dos seus componentes, preparando a célula para a divisão.

Na fase log, logarítmica ou de crescimento intenso, ocorre um aumento acelerado da população bacteriana, com divisões constantes das células, através do consumo de nutrientes disponíveis no meio e com a produção de diversas substâncias que são excretadas para fora da célula.

Na fase estacionária, logo após a fase log, a taxa de morte da população bacteriana se iguala a sua taxa de crescimento, por isso, não é observado mais um aumento da população e, sim, uma constância de densidade. Nessa fase, os nutrientes já se encontram em concentrações mínimas e ocorre um acúmulo de substâncias que vão interferir na viabilidade celular das bactérias. No final dessa fase, as bactérias começam a apresentar o chamado metabolismo endógeno, em que consomem suas organelas reservas de fonte de carbono e energia.

Na fase de declínio ou morte, os nutrientes já foram totalmente consumidos, o nível de concentração de substâncias tóxicas para a população bacteriana é elevado e a taxa de morte é aceleradamente positiva.

As bactérias desempenham um papel de suma importância para o ambiente e a atividade humana em geral: participam da reciclagem de nutrientes na natureza, fazem parte da microbiota do corpo humano, são grandes produtores de substâncias com aplicação biotecnológica diversa, como antibióticos, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, utilizadas na produção de alimentos diversos, entre outros.

O grupo bacteriano vai se destacar também pelo potencial de provocar doenças infecciosas diversas e doenças transmitidas por alimentos e água (DTAs).

As doenças transmitidas por alimentos e água podem ser classificadas em infecções alimentares, intoxicações alimentares e toxiinfecções alimentares.

As infecções alimentares são as doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados, em sua maioria, por um número elevado de células bacterianas, que provocarão um quadro de infecção quando atingirem o trato intestinal humano.

As intoxicações alimentares são as doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas produzidas previamente pelo microrganismo patogênico.

As toxiinfecções alimentares são as doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados por um número elevado de células bacterianas, que apresentam o potencial infeccioso, com produção de toxinas no interior do trato intestinal.

É interessante ressaltar que as DTAs podem ser provocadas por microrganismos diversos, embora seja o grupo bacteriano que mais se destaca na veiculação de doenças através dos alimentos.

Alguns gêneros e espécies mais conhecidos e estudados do grupo das bactérias são: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, entre outros.

- **Complemente as informações que você recebeu com uma pesquisa nos livros de Microbiologia Básica e páginas especializadas na Internet, sobre os seguintes grupos bacterianos: arquea, cianobactérias e actinomicetos (bactérias filamentosas).**

FUNGOS

Os fungos são constituídos por células eucariotas, com parede celular rica em quitina em sua maioria (Figura 3) e se dividem em dois grupos principais: **fungos filamentosos** (mofo, bolor) e **leveduras** (fungos unicelulares).

Os fungos filamentosos são multicelulares ou pluricelulares. Os seus filamentos são chamados de hifas, que podem apresentar-se como cenocítica ou hifas que não apresentam septos, separando as células umas das outras e hifas septadas mononucleadas ou multinucleadas. O conjunto de hifas é denominado de micélio e representa o corpo fúngico com características morfológicas específicas para cada gênero: algodinoso, aveludado, com ou sem pigmentação, crescimento intenso ou discreto entre outros.

Figura 3. Esquema de uma célula eucariota.

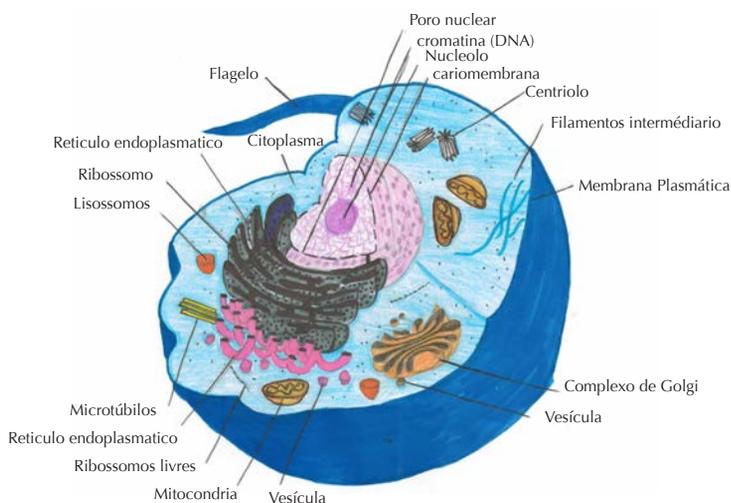


Ilustração: Érica Gabriela B. Santos (Graduanda do curso superior de Tecnologia e Agroecologia / IFB - Campus Planaltina)

Os fungos são microrganismos amplamente espalhados pelo ambiente em geral. Todos são heterotróficos e a grande maioria é aeróbio ou anaeróbio facultativo (leveduras). Os fungos crescem normalmente em ambientes onde o pH é próximo a 5,0 e toleram muito bem concentrações relativamente altas de açúcar ou sal. Ademais, podem crescer muito bem em ambientes com baixo teor de umidade.

Os fungos são considerados grandes biodegradadores de matéria orgânica, como carboidratos complexos, por causa da sua capacidade de sintetizar e expressar enzimas hidrolíticas.

Os fungos se destacam no ambiente também por suas associações benéficas: se associam às raízes da maioria das plantas, em uma interação simbiótica, formando as **micorrizas**, que ajudam as plantas a absorverem minerais e água do solo, e também constituem os **líquens**, que são uma combinação de uma alga verde (ou uma cianobactéria) com um fungo, em uma associação mutualística.

- **Realize uma pesquisa consultando livros e sites especializados na Internet, buscando mais informações sobre os diversos tipos de micorrizas e líquens e sua importância para o meio ambiente.**

Os fungos são utilizados pelo homem como alimentos e na produção de alimentos e bebidas, além de produzirem uma grande variedade de substâncias com aplicação diversas (antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, entre outros).

A grande maioria dos gêneros fúngicos é benéfica, contudo, alguns apresentam potencial patogênico, provocando doenças, principalmente, em plantas economicamente importantes (fungos fitopatogênicos). São registrados também algumas doenças em humanos como alergias, infecções fúngicas, doenças provocadas pela ingestão de micotoxinas (toxinas produzidas por fungos em determinadas condições ambientais).

Alguns gêneros fúngicos (filamentosos) são bastante conhecidos e estudados: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Agaricus*, entre outros.

Os fungos se reproduzem **assexuadamente**, através de mecanismos de esporulação, brotamento ou gemulação e fragmentação, e **sexuadamente**, através da esporulação.

As leveduras são fungos unicelulares, que apresentam células nas formas ovais ou esféricas. Também são amplamente encontradas na natureza e podem ser observadas como um pó fino e branco cobrindo folhas e frutas.

As leveduras se dividem assexuadamente através do brotamento, em que ocorre o desenvolvimento de um broto (célula filha), na superfície da

célula parental (mãe). No final do processo de separação ocorre a formação de duas células desiguais, ficando a célula mãe com cicatrizes em sua superfície.

As leveduras podem também se dividir assexuadamente por fissão, produzindo, a partir de uma célula mãe, duas células idênticas. Também podem se dividir sexuadamente através da formação de esporos.

Grande parte das leveduras apresenta-se como anaeróbicos facultativos, o que as tornam capazes de crescerem em diversos ambientes. Na presença de O_2 , as leveduras realizam a respiração aeróbia e, na sua ausência, elas podem fermentar carboidratos e produzir etanol e dióxido de carbono. Esse processo fermentativo é usado na produção de cerveja, vinho e nos diversos processos de panificação.

A levedura mais conhecida e utilizada pela humanidade é do gênero *Saccharomyces*. Outros gêneros conhecidos são *Candida* e *Rhodotorula* entre outros.

Os fungos podem ser classificados com base nas suas estruturas de reprodução e no tipo de hifa que os constituem. Serão apresentados a seguir apenas quatro filos principais que englobam gêneros que se destacam no ambiente e vida humana: zigomiceto, ascomiceto, basidiomiceto (classes de fungos chamados perfeitos por terem sido registrados seus ciclos de vida sexual e assexuado) e deuteromiceto (classe de fungos imperfeitos, por ter sido observado apenas seu ciclo de vida assexuado).

O **Filo zigomiceto**, também chamado de fungos de conjugação, reúne fungos filamentosos e que apresentam hifas cenocíticas. O gênero mais conhecido é o *Rhizopus* (*R. nigricans*, representado normalmente pelo bolor preto do pão). Os esporos assexuais são chamados de esporangiósporos e os sexuais (formados a partir da fusão de duas células compatíveis) são denominados zigósporos. A partir de cada esporo, em condições adequadas, irá germinar um novo fungo.

O **Filo ascomiceto**, ou fungos de saco, inclui fungos com hifas septadas e algumas leveduras. Os esporos assexuais são chamados de conídios produzidos em cadeias a partir de um corpo de frutificação microscópico (conidióforo). Esses esporos são liberados facilmente no ambiente e flutuam no ar como poeira. Os esporos sexuais, chamados de ascósporos, são produzidos em uma estrutura em forma de saco conhecido como asco. Gêneros bastante conhecidos são o *Neurospora* (muito estudado pela engenharia genética), *Talaromyces* e *Aspergillus*.

O **Filo basidiomiceto** é bastante conhecido por incluir os fungos que produzem os cogumelos, corpos de frutificação macroscópicos. Apresentam hifas septadas. Os esporos sexuais são chamados de basidiósporos, formados externamente em um pedestal conhecido como basídio (forma de clava), normalmente em número de quatro esporos por basídio. Alguns basidiomicetos podem formar esporos assexuais do tipo conidiósporos, mas, em geral, na sua fase assexuada, se reproduzem por fragmentação do micélio. Gêneros conhecidos: *Amanita muscaria* (produz neurotoxina), *Lentinus*, *Pleurotus*, *Agaricus* (com espécies comestíveis) entre outros.

Os fungos do **filo deuteromiceto** deste filo são chamados de imperfeitos, pois não foi observado ainda o seu ciclo sexual de reprodução. São considerados uma classe de espera, transitória. É conhecido apenas a fase assexuada de reprodução. Os esporos assexuais mais conhecidos são os conidiósporos (conídios), sintetizados por um corpo de frutificação (conidióforo) formados a partir da hifa. Ficam livres, mantidos em uma cadeia de esporos. Gênero mais conhecido: *Penicillium*.

- **Você deve fazer uma pesquisa nos livros de Microbiologia Básica e páginas especializadas na Internet para complementar e aprofundar as informações sobre as principais classes fúngicas existentes, além de informações básicas sobre os protistas semelhantes a fungos (fungos aquáticos e fungos limosos).**

PARTE 2
Introdução a
Microbiologia Prática

O laboratório de Microbiologia trabalha com uma variedade de microrganismos e materiais contaminados. Alguns desses organismos são patógenos oportunistas ou podem vir a sê-lo de acordo com as circunstâncias e a dose da contaminação.

É essencial a adoção de normas de prevenção dentro de um programa de boas práticas de manipulação de microrganismos nos laboratórios de Microbiologia. É preciso proteger a todas as pessoas que desenvolvem alguma atividade no laboratório: professores e técnicos, pesquisadores, estagiários e alunos, além de evitar a contaminação dos seus experimentos e do ambiente laboratorial.

Segurança é sinônimo de boa técnica e, desse princípio parte a necessidade do adequado preparo e treinamento dos manipuladores de microrganismos. A segurança biológica se fundamenta na adoção de procedimentos microbiológicos corretos por parte de todos os usuários do laboratório de Microbiologia.

SEGURANÇA EM Microbiologia

Para reduzir o risco de contaminação ao se trabalhar com microrganismos, é necessário saber: o perigo em potencial dos microrganismos com os quais se está trabalhando; as rotas de entrada no corpo e de infecções; e os métodos corretos de contenção dos microrganismos, para que esses não tenham acesso às rotas de entrada.

Os microrganismos podem ser classificados em grupos de risco I, II, III e IV, com base na sua capacidade de causar doenças no indivíduo manipulador e se espalhar na comunidade.

- **Verifique quais os microrganismos são manipulados no laboratório de Microbiologia que você está tendo as aulas práticas e qual a sua classificação de risco.**

As principais rotas de infecção ou portas de entrada de microrganismos, no corpo humano, no ambiente laboratorial são: **boca** (ingestão) pipetação, mãos e materiais contaminados; **pulmões** (inalação) ar contaminado; **pele**: agulhas contaminadas, pipetas Pasteur, vidros infectados quebrados; **olhos**: através de respingos contaminados.

Os acidentes que podem ocorrer em um laboratório de Microbiologia englobam aqueles de riscos biológicos (infecções respiratórias, alergias, micoses, intoxicações entre outros), além de riscos químicos, físicos e ergonômicos.

A prevenção de infecções adquiridas em laboratórios deve considerar uma **barreira primária** (equipamentos de proteção individual, boas técnicas de manipulação), para prevenir a dispersão dos microrganismos no laboratório; uma **barreira secundária** (boas técnicas de manipulação, câmara de segurança biológica), para proporcionar uma rede de segurança ao redor do manipulador; e uma **barreira terciária** (boas técnicas de manipulação, métodos eficientes de controle de microrganismos, descarte controlado de resíduos produzidos no laboratório), para prevenir o escape dos microrganismos patogênicos que coloquem em risco a comunidade.

NORMAS BÁSICAS DE BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIO

- Tenha sempre disponível os equipamentos de proteção individual (EPIs) obrigatórios: jaleco ou guarda pó de manga longa limpo e máscaras de proteção descartáveis, luvas de procedimentos descartáveis, visor de proteção.
- Lave muito bem as mãos e os antebraços antes de iniciar ou concluir qualquer atividade no laboratório. Após a lavagem, desinfete mãos e antebraços com álcool iodado ou álcool 70%.

- Use óculos de segurança nas tarefas que apresentarem riscos.
- Não toque em maçanetas, interruptores ou telefones usando luvas.
- Use sempre calças compridas e sapatos fechados.
- Retire jóias, anéis, relógios e pulseiras. As unhas devem ser curtas e sem esmalte. Os cabelos compridos deverão estar bem presos.
- Não toque olhos, boca cabelo com as mãos durante o trabalho. Se isso ocorrer, adote procedimentos de higienização adequados.
- Em caso de cortes ou ferimentos, proceder imediatamente a limpeza e desinfecção.
- Caso suspeite de contaminação/intoxicação avise o professor ou monitor com urgência.
- Não coma, beba, masque chicletes ou fume no laboratório.
- Jamais guarde alimentos/ bebidas de consumo próprio no refrigerador do laboratório. Não prepare café, chá, pipoca ou outros alimentos na área do laboratório.
- Evite conversas desnecessárias, visando prevenir a contaminação do manipulador e da amostra.
- Desinfete as bancadas com produtos adequados (desinfetantes e papeis descartáveis) antes e após o trabalho.
- Jamais coloque materiais contaminados (lâminas, pipetas, entre outros) sobre as bancadas ou a câmara de fluxo laminar. Quando o descarte durante as atividades for necessário, providencie antecipadamente um recipiente adequado com desinfetante.
- Todo material deve ser pipetado cuidadosamente com pipetadores automáticos ou peras.
- Trate todas as culturas de microrganismos como potencialmente patogênicas.

- Identifique de maneira clara e completa os materiais particulares (por exemplo: **tipo de amostra, data, nome da equipe, turma, método, meio de cultivo, microrganismo inoculado, entre outras informações pertinentes**).
- Todo material contaminado deve obrigatoriamente ser esterilizado antes do descarte.
- Ao sair do laboratório feche os registros de gás e as torneiras, desligue as luzes e os equipamentos (devidamente limpos), limpe e organize todo o material utilizado.

CONTROLE DE MICRORGANISMOS

O controle microbiano no laboratório se dá através de métodos físicos e químicos.

Temperaturas elevadas (calor seco ou úmido) e temperaturas baixas (refrigeração e congelamento) são os métodos físicos mais utilizados no laboratório para controle da população microbiana. Também são utilizados a radiação ultra violeta (UV) e a filtração, quando pertinentes.

As substâncias como hipoclorito de sódio (concentração de 200 a 5000 ppm), álcool 70% e álcool iodado são as mais comumente usadas para o controle químico de microrganismos. O cloro é considerado um desinfetante universal, pois mata a maioria das células bacterianas e age sobre alguns tipos de vírus e fungos. O iodo é ativo contra células bacterianas, alguns vírus e esporos, muito usado como sanitizante cutâneo. O álcool 70% age sobre as células vegetativas de bactérias e fungos e inativa alguns vírus, porém não age sobre esporos.

- **Porque o álcool na concentração de 70% é mais eficiente que em concentrações próximas de 100%?**

Os seguintes termos são usados para descrever os processos físicos e químicos empregados no controle de microrganismos:

Esterilização: processo de destruição de todas as formas de vida microscópica. Ausência total ou destruição total de todos os microrganismos.

- Fogo (flambar) para alças de inoculação. Calor seco, forno com temperatura controlada, com ventilação, para temperatura homogênea. Temperatura mínima de 160°C, por duas horas.
- Calor úmido sob pressão (autoclaves): 121°C, por 15 minutos, para materiais com baixo nível de contaminação; 20 a 30 minutos, para materiais com alto nível de contaminação.

Esterilização comercial: tratamento térmico para alimentos, que inativa os microrganismos patogênicos e deterioradores que possam crescer em condições normais de estocagem. Normalmente sobrevivem a esse processo esporos bacterianos termorresistentes não patogênicos.

Água em ebulição: células vegetativas podem ser destruídas em alguns minutos, mas esporos resistirão por várias horas. É um método de desinfecção e não de esterilização.

Pasteurização: tratamento térmico controlado que mata certos microrganismos, mas, não elimina todas as bactérias presentes. Leite, creme e certas bebidas alcoólicas (cerveja e vinho). Temperatura: baseada no tempo de morte térmica característica das espécies patogênicas (*Mycobacterium tuberculosis*–60°C/ 15 min). Pasteurização lenta, 62°C/ 30 min, ou rápida, 75°C/ 15 a 20 seg.

Desinfecção: processo que objetiva a redução ou eliminação de parte da carga microbiana, tendo como alvo principal os microrganismos patogênicos.

AULA PRÁTICA 1 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TOTAIS PRESENTES NAS DIGITAIS DAS MÃOS

MATERIAL

Meio de cultura: Ágar padrão, PCA, AN em Placa de Petri; Estufa microbiana a 35°/37°C;

Bico de Bunsen ou lamparina ou vela; caneta para escrita em vidro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Realizar o procedimento de coleta das digitais dos dedos das mãos, na Placa de Petri com Ágar padrão, próximo ao bico de Bunsen ou lamparina com assepsia, conforme orientação/demonstração do(a) professor(a);
- efetuar a identificação da placa com: tipo de procedimento, data, responsável pela coleta e equipe de trabalho;
- incubar em estufa microbiana a 35–37°C por até 48 horas. Após a incubação, armazenar sob refrigeração (5 a 7°C) até a leitura dos resultados;
- após a leitura, descartar o material contaminado após esterilização (autoclave, 121°C/30 min) e efetuar a higienização recomendada.

RESULTADOS

		Características Morfológicas Culturais		
Meio de cultura	Intensidade do crescimento em placa	Forma da colônia	Tamanho da colônia	Textura, estrutura e pigmentação da colônia

Intensidade: +++: crescimento intenso; ++: crescimento moderado; +: crescimento pequeno; -: ausência de crescimento.

Caracterização macroscópica de colônias bacterianas

As colônias visíveis a olho nu podem ser classificadas quanto ao: **Tamanho**, que pode variar entre uma fração de milímetro até 10 mm de diâmetro; **Bordos**, que podem se apresentar como lisos, ondulados, lobulados, lacerados ou filamentosos; á **Elevação**, que classifica as colônias como chatas, côncavas, convexas, ondulada, elevada ou protuberante; á **Pigmentação**, quando apresentam cor ou não; e á **Forma**, podendo ser circulares, irregulares, rizóides, filamentosas ou puntiformes.

QUESTÕES PARA RESPONDER

1. Que tipo de material é possível encontrar na superfície de suas mãos?
2. Quais os grupos microbianos que mais aparecem contaminando as mãos?
3. Faça uma pesquisa sobre os gêneros microbianos mais frequentes nas mãos de uma pessoa.
4. Quais as principais necessidades devem ser atendidas para um crescimento adequado das bactérias?

AULA PRÁTICA 2 - ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS A PARTIR DE AMOSTRA AMBIENTAL OU DE ALIMENTOS

MATERIAL

Amostra ambiental ou de alimentos; Meio de cultura: Ágar padrão, PCA, ou AN em Placa de Petri (Bactérias totais) e Ágar PDA (Fungos totais); Erlenmeyer com 90 mL de água de diluição, solução salina (0,9%) ou água peptonada (0,1%) estéril; tubos de ensaio contendo 9 mL de água de diluição estéril; espátula estéril; pipeta graduada de 1 mL estéril; estufa microbiana a 35–37°C (bactérias totais) e 25–30°C (fungos totais); Bico de Bunsen ou lamparina ou vela; caneta para escrita em vidro.

Diluição da Amostra

A diluição da amostra (quando necessária) tem o objetivo de promover o isolamento das colônias para análises qualitativas e quantitativas.

A amostra deve ser homogeneizada e pesada adequadamente (líquida ou sólida) e então transferida assepticamente para efetuar as diluições necessárias.

Técnica de Espalhamento (Spread Plate)

Esse é o método mais usado para a quantificação dos microrganismos aeróbios.

Com a diluição recomendada (para a obtenção de 25 a 300 unidades formadoras de colônias/ placa), deverá ser distribuído 0,1 mL da amostra diluída em uma placa contendo o meio de cultura. Sobre a superfície do meio e com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhe cuidadosamente o conteúdo inoculado. Espere a absorção e incube em estufa microbiana.

Técnica de Profundidade (Pour Plate)

A partir das diluições adequadas, pipetar 0,1 ou 1 mL diretamente em Placas de Petri esterilizadas e inicialmente sem meio. Verter 20 a 30 mL do meio recomendado liquefeito e resfriado aproximadamente a 45°C. Feche a placa e movimente-a lentamente/suavemente em forma de oito, visando a perfeita mistura da cultura com o ágar. Espere solidificar e incube as placas invertidas a 35-37°C/48 horas, após identificação.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

- Realizar a coleta da amostra ambiental ou de alimentos, atendendo às recomendações de assepsia;
- pesar 10 gramas ou 10 mL de amostra em balança digital, em béquer estéril, em condições de assepsia;
- adicionar cuidadosamente a amostra pesada no Erlenmeyer contendo 90 mL de água de diluição e homogeneizar cuidadosamente (diluição 1:10);
- a partir da diluição 1:10, transferir asepticamente 1 mL para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água de diluição (diluição 1:100). Homogeneizar e repetir o procedimento para o preparo das diluições 1:1000 e 1:10.000;
- asepticamente, efetuar a semeadura de 0,1 mL da diluição 1:10.000 no centro das placas contendo meio de cultura;
- efetuar a identificação da placa com: tipo de procedimento, data, responsável pela coleta e equipe de trabalho;
- incubar, em estufa microbiana, a 35–37°C por até 48 horas (Ágar padrão), e a 30°C (Ágar PDA), por 72 horas. Após a incubação, armazenar sob refrigeração (5 a 7°C) até a leitura dos resultados; e
- após a leitura, descartar o material contaminado após esterilização (autoclave, 121°C/30 min) e efetuar a higienização recomendada.

RESULTADOS

Contar as placas que contenham preferencialmente de 25 a 300 colônias por placa. O ideal é proceda essa técnica em duplicata ou triplicata, tirando a média das contagens.

A concentração é determinada multiplicando-se a contagem média das placas pelo inverso da diluição inoculada e pela quantidade da amostra adicionada. No caso da técnica do espalhamento, que emprega uma alíquota menor (0,1 mL), para que o resultado seja expresso em UFC/mL, o valor obtido deverá ser multiplicado por 10.

Meio de cultura	Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL	Características morfológicas culturais
Ágar padrão (bactérias totais)		
Ágar PDA (fungos totais)		

QUESTÕES PARA RESPONDER:

1. Por que o meio na técnica do “pour plate” deve ser mantido fundido a no máximo a 50°C?
2. Cite os motivos pelos quais o número de colônias em placas nas técnicas de quantificação deve ficar entre 25 e 300.
3. As colônias que crescem imersas no Ágar “pour plate”) são menores do que aquelas que crescem na superfície? Justifique.
4. Por que a técnica de “spread plate” é mais indicada para aeróbicos estritos?
5. Liste as principais fontes de erros dessas técnicas.

AULA PRÁTICA 3- MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES

1. MÉTODO DE SEDIMENTAÇÃO

Esse método consiste em expor uma placa de Petri com 20 mL de meio seletivo ou não seletivo ao ambiente, As células se depositam por gravidade e as colônias são contadas após incubação em estufa microbiana de crescimento.

MATERIAL

Meio de cultura: Ágar padrão, PCA, ou AN em Placa de Petri (Bactérias totais) e Ágar PDA (fungos totais); e caneta para identificação em vidro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- A amostragem deve ser feita perto de equipamentos abertos e outros locais nos quais as correntes de ar podem levar a contaminação;
- diferentes pontos devem ser amostrados;
- abrir as placas (duplicata ou triplicata) contendo um Ágar específico e deixar um tempo de exposição de no mínimo 15 min; e
- incubar as placas após a exposição a 35–37°C para Ágar padrão, por 24 – 48 horas ou 25–30°C para Ágar PDA, por 72 horas.

RESULTADOS

- Expressar o resultado em número de microrganismos viáveis/ área de placa de Petri (área padrão: 70,88 cm²)/ tempo de exposição (15 min a 2 horas).

2. MÉTODO DE SOLUÇÃO DE ENXAGUE

Esse método é adequado para verificar a sanitização de vidrarias e também de recipientes maiores e equipamentos. Usa-se uma solução de enxague denominada “Solução de Ringer”, a qual é distribuída no recipiente e agitada para ressuspender os microrganismos remanescentes que se encontram nas paredes. Logo após, essa solução é plaqueada, incubada e é feita a contagem.

A partir da solução de Ringer é possível pesquisar vários indicadores microbianos, como coliformes totais, coliformes termotolerantes, bactérias totais, fungos totais, E. coli, Salmonella sp., entre outros.

MATERIAL

Solução de Ringer: 2,15g de Cloreto de sódio p.a; 0,075g de Cloreto de potássio p.a; 0,12g de Cloreto de cálcio anidro p.a; 0,5g de Tiosulfato de Na pentahidratado; 1000 mL de água destilada (q.s.p); pH final de 6.6. Emprega-se na diluição 1.4 da original, em água destilada; Ágar padrão ou PCA estéril liquefeito ($\pm 50^{\circ}\text{C}$); Placa de Petri estéril; pipeta graduada estéril; Bico de Bunsen ou lamparina; e caneta para identificação em vidro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Adicionar 10 mL de solução de Ringer no recipiente a ser analisado e agitar cuidadosamente;

- retirar uma alíquota de 1 mL e distribuir em placas de Petri (duplicata/triplicata) e fazer inoculação tipo “pour plate” com o Ágar liquefeito; e
- incubar, a 35-37°C, por até 72 horas.

RESULTADOS

- Proceder a contagem das colônias nas placas, multiplicando o resultado por 100 (1 mL de 10 mL, diluição de 100x).

3. MÉTODO DO ESFREGAÇO DE SUPERFÍCIE (SWAB)

Esse método é recomendado para monitoramento microbiológico de superfícies de trabalho, pisos, paredes, cantos, equipamentos, carcaças e cortes de animais.

Quando não for possível o uso da cartolina como o padrão de área (para vasilhames pequenos, espátulas, talheres, pratos), use a mesma técnica, mas, com o cuidado de passar o cotonete nas peças por inteiro, sendo o resultado expresso por número de UFC/peça.

MATERIAL

Tubos de ensaio com 9 mL de Solução de Ringer; cotonetes de madeira/algodão hidrofóbico estéreis; quadrados de cartolina de área interna de 25 cm² esterilizados; Placa de Petri estéril; Ágar padrão ou PCA liquefeito ($\pm 50^\circ\text{C}$); pipeta graduada estéril; Bico de Bunsen ou lamparina; e caneta para identificação em vidro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Colocar o padrão de cartolina estéril sobre a superfície a ser examinada;
- submergir um dos cotonetes (swab) na solução de Ringer em tubo;
- aplicar o swab, com pressão, na área interna do padrão, atentando para que a superfície do algodão entre em contato com a área;
- recolocar o swab no mesmo tubo contendo a solução de Ringer, quebrando a extremidade que entrou em contato com a mão do manipulador;
- repetir a operação com outro swab seco, ou seja, sem umedecê-lo previamente;
- colocar este segundo swab no mesmo tubo de ensaio do swab anterior, também quebrando a extremidade do cotonete;
- agitar energicamente os tubos deixando-os em repouso por 3 min.
- inocular, pela técnica do *pour plate*, 1 ou 0.1 mL da solução de Ringer no Ágar (PCA); e
- Incubar, a 35°C, por 72 horas.

RESULTADOS

- Efetuar a contagem das colônias nas placas e emitir o resultado como número de UFC/ 25 cm² de área avaliada.

QUESTÕES PARA RESPONDER

1. Qual a importância da realização de um monitoramento microbiológico ambiental?

2. Qual o principal objetivo do método de solução de enxague e do método do esfregão em superfície?
3. Os resultados obtidos deverão ser comparados com padrões de referência. Quais são esses padrões?
4. Quais grupos microbianos indicadores podem ser pesquisados a partir da solução de Ringer utilizada como solução diluente ou de enxague?

AULA PRÁTICA 4 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS

MATERIAL

Ágar Sabouraud ou PDA em Placa de Petri; cultivos prévios dos fungos a serem avaliados; microcultivo fúngico em placa; pinças metálicas; béquer com álcool comercial; alça de inoculação

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Medição do crescimento de fungos filamentosos

- Exatamente no centro de uma Placa de Petri (**sem espalhar**) e com o auxílio de uma alça ou agulha de inoculação, inocule o fungo destinado à sua equipe.
- Verificar a velocidade de crescimento dos fungos aproximadamente a cada 2 dias, com paquímetro e registrar em planilha.

Fungo:	
Data	Crescimento da colônia fúngica (mm)

Caracterização morfológica de fungos

- Examine as Placas de Petri com crescimento fúngico e anote as características observadas (por exemplo: cor da colônia fúngica, aparência cotonosa, aveludada, crescimento intenso, moderado ou pequeno).

Características morfológicas culturais				
Meio de cultura/ Fungo	Intensidade do crescimento em placa	Forma da colônia	Tamanho da colônia	Textura, estrutura e pigmentação da colônia

Intensidade: +++: crescimento intenso; ++: crescimento moderado; +: crescimento pequeno

- Examine ao microscópio, nas objetivas de aumento de 4 e 10x, os fungos filamentosos (preparo de lâmina à fresco) e identifique: hifas aéreas (presença ou ausência de septos e coloração), hifas submersas e corpos de frutificação (endógenos/ exógenos, forma, tamanho, cor).

Exame de leveduras a fresco

- Sobre uma lâmina limpa, coloque uma gota do meio líquido com *Saccharomyces cerevisiae* e cubra com uma lamínula. Examine ao microscópio e anotar as características observadas (forma, tamanho, presença de esporos/pseudo hifas).

Meio de cultura/Fungo/Aumento	Características microscópicas

Isolamento fúngico

- Em uma Placa de Petri contendo PDA ou Ágar Sabouraud, procure fixar no centro alguns grãos/oleaginosas (por exemplo, amendoim, feijão, arroz, trigo, soja). Incube a 25–30°C, por 5 dias, ou à temperatura ambiente e verifique o crescimento fúngico através de análise macro e microscópica.

Meio de cultura/ Fungo/Aumento	Características macroscópica e microscópicas

- Microcultivo (figura 4)
- Selecione uma Placa de Petri com o microcultivo de fungos filamentosos e da levedura *S. cerevisiae*:
 - a) Com o auxílio de uma pinça, retire a lâmina com as lamínulas e observe as estrias ao microscópio, (aumento de 10 e 40x).
 - b) Observe a morfologia das células, filamentos e principalmente a presença ou não de pseudomicélio (leveduras). Registre as observações.

Figura 04. Exemplo de microcultivo de fungos. Laboratório de Microbiologia, DAQBI/UTFPR.



Meio de cultura/Fungo/Aumento	Características microscópicas

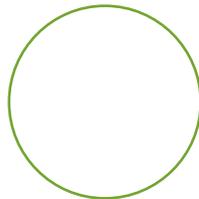
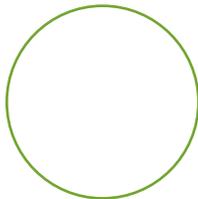
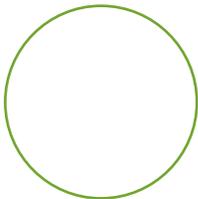
QUESTÕES PARA RESPONDER

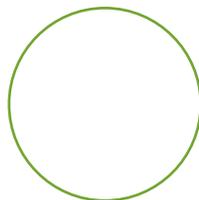
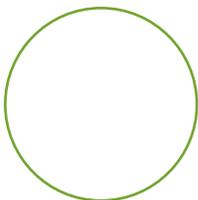
1. Quais as principais diferenças entre o cultivo dos fungos e das bactérias?
2. Quais as principais necessidades que devem ser atendidas para um crescimento adequado dos fungos?
3. A técnica do microcultivo fúngico é adequada para realizar que tipo de estudo? Porque?
4. A preparação à fresco do crescimento fúngico é adequado para análise microscópica? Quais as vantagens e desvantagens?

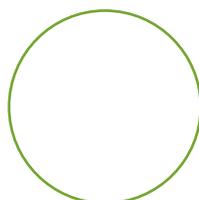
PLANILHA DE OBSERVAÇÃO

MATERIAL: _____

Observe as lâminas e desenhe as características observadas, por exemplo, forma, arranjo, coloração, entre outros.







OBSERVAÇÕES:

AULA PRÁTICA 5 - TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA COLORAÇÃO

1. Preparo do esfregaço

- Limpar a lâmina com papel macio;
- para a cultura microbiana proveniente de meios sólidos, colocar uma gota de água destilada estéril sobre a superfície da lâmina, em seguida, com a alça de platina flambada ao rubro, coletar uma pequena porção do material a ser analisado e esfregá-lo sobre a gota de água, espalhando pela área central da superfície da lâmina;
- para a cultura proveniente de meios líquidos: com auxílio da alça de platina, coletar uma pequena porção do material a ser analisado e esfregá-lo, espalhando pela área central da superfície da lâmina;
- deixar a lâmina secar à temperatura ambiente.
- para um melhor resultado, utilizar culturas que tenham até 48 horas de incubação. Para materiais muito espessos, recomenda-se diluí-los em solução salina estéril e para aqueles muito diluídos recomenda-se concentração através de centrifugação (3000rpm/ 15 min), decantando o sobrenadante e procedendo o esfregaço a partir do sedimento.

2. Fixação do material

- Passar a lâmina na chama do Bico de Bunsen ou lamparina (parte azul), rapidamente três vezes, com o lado do material a ser analisado voltado para cima. A lâmina não deve aquecer excessivamente.

3. Coloração

A técnica de coloração varia de acordo com o objetivo da visualização (coloração simples, de flagelos, esporos, cápsula, etc.). Recomenda-se que os corantes não sejam preparados com demasiada antecedência, sendo que antes do uso, esses devem ser filtrados para que resíduos não interfiram na leitura.

COLORAÇÃO DE GRAM

Essa coloração é muito empregada, visto que a maioria das bactérias cora-se por esse método. A técnica não permite a observação de estruturas internas, mas permite observar forma e fornece informações a respeito do tipo de parede celular da bactéria.

MATERIAL

Solução de cristal violeta ou violeta de genciana; lugol; álcool-acetona; fucsina ou safranina.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Preparar um esfregaço no centro da lâmina e deixar secar ao ar;
- cobrir toda a lâmina com cristal violeta, aguardar 1 min e desprezar o excesso do corante;
- cobrir a lâmina com lugol (solução de iodo) aguardar 1 min e 30 s, desprezar o excesso de corante;
- com o auxílio de um pisseti, lavar a lâmina com solução de álcool-acetona até que a gota que escorre seja incolor, respeitando, contudo, o tempo de 10 a 20 s;
- lavar a lâmina com água corrente de baixa pressão (pisseti);
- cobrir a lâmina com Fucsina ou safranina e aguardar 30 s;

- lavar a lâmina com água corrente de baixa pressão (pisseti);
- deixar secar espontaneamente ao ar; e
- proceder a leitura ao microscópio ótico em objetiva de imersão (100X).

RESULTADO

- Células violetas (Gram +); células vermelhas (Gram -).
- Enzimas líticas normalmente secretadas por culturas envelhecidas podem causar danos à membrana da célula, alterando, por exemplo, a permeabilidade aos solventes (álcool acetona). Consequentemente, o complexo iodo-cristal violeta poderá ser retirado da célula e a essa acaba corando-se de vermelho (fucsina).

COLORAÇÃO DE ESPOROS (Método Bartolomew Mittwers)

MATERIAL

Safranina 0,25%; verde malaquita solução saturada a 7,6%.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Preparar um esfregão no centro da lâmina e deixa secar ao ar;
- fixar na chama por 20 minutos x;
- corar por 10 min com solução de verde malaquita;
- corar 15 seg com solução de safranina;
- lavar com água destilada, escorrer e secar ao ar; e
- observar em óleo de imersão, objetiva de 100X.

RESULTADO

Os esporos coram-se em verde e o resto da célula em vermelho.

COLORAÇÃO DE BAINHA (Método Jenkins)

MATERIAL

Solução de cristal violeta (0,1% em água destilada)

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Coletar a amostra cuidadosamente homogeneizada e colocar uma gota em uma lâmina. Misturar com uma gota da solução de cristal violeta;
- cobrir a lamina com lamínula; e
- observar em óleo de imersão, objetiva de 100X.

RESULTADO

- As células ficam coradas de violeta escuro, enquanto as bainhas ficam coradas de rosa claro.

QUESTÕES PARA RESPONDER:

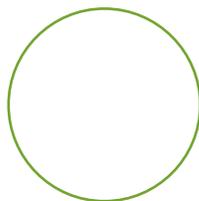
1. Diferencie uma coloração simples de uma coloração diferencial.
2. Quais os objetivos da coloração de Gram?
3. Quais os principais cuidados que devem ser tomados com relação ao uso do microscópio?
4. O que deve ser feito com os resíduos produzidos no processo da coloração?

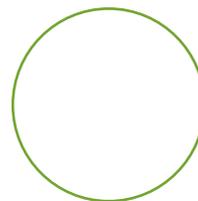
PLANILHA DE OBSERVAÇÃO

MATERIAL: _____

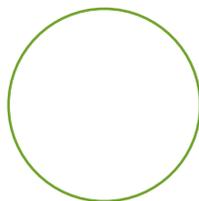
Observe as lâminas e desenhe as características observadas, por exemplo, forma, arranjo, coloração entre outros.



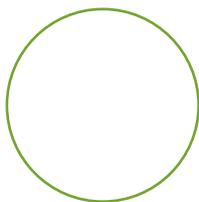


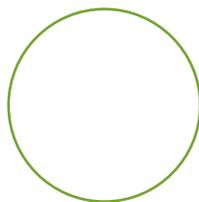


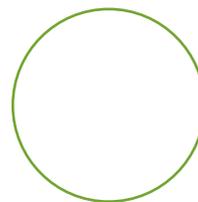












OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS

BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. *Microbiologia básica*. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

BLACK, J.G. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002, p.829.

BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. *Microbiologia para as ciências da saúde*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998, p.287.

COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3° ed. New York: American Public Health Association, 1992.

GRIST, N.R. *Manual de biossegurança para o laboratório*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1995, p133.

MAZA, L.M.L.; PEZZLO, M.T.; BARON, E.J. *Atlas de diagnóstico em Microbiologia*. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2001.

NEDER, R.N. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: Editora Nobel, 1992, p.138.

PELCZAR JR, M. J. *Microbiologia: conceitos básicos e aplicações*. V. 1, 2ª Ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. *Microbiologia prática: roteiro e manual – bactérias e fungos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2002, 112p.

SILVA, N. et al. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Editora Varela, 2007, p.536.

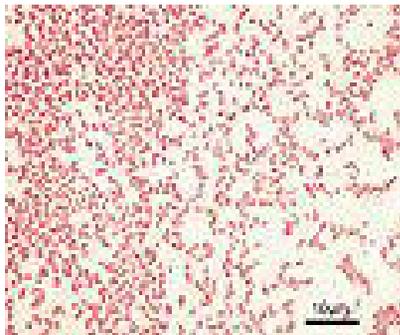
SOARES, JB.; CASIMIRO, ARS.; AGUIAR, LMB. *Microbiologia: uma abordagem prática*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1986, 194p.

SOUNIS, E. *Curso prático de Microbiologia*. 2ª Ed., Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora, 1989, p.267.

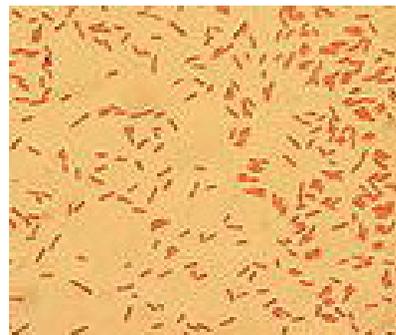
TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE C. L. *Microbiologia*. 6ª. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2000.

MICROSCOPIA DE BACTÉRIAS

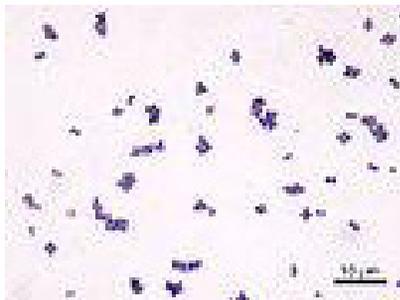
Figura 5. Coloração de Gram de diferentes espécies bacterianas (microscopia ótica, aumento 1000X). Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Gram_stains, (PD-USGOV-HHS-CDC, Domínio livre); Laboratório de Microbiologia, DAQBI/UTFPR/Fotos tiradas nas aulas práticas de Microbiologia



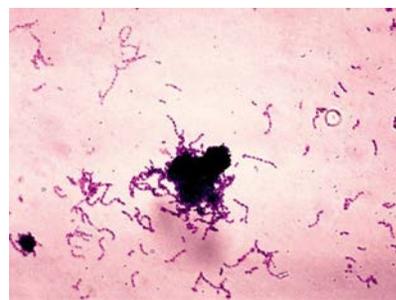
A. Pseudomonas aeruginosa



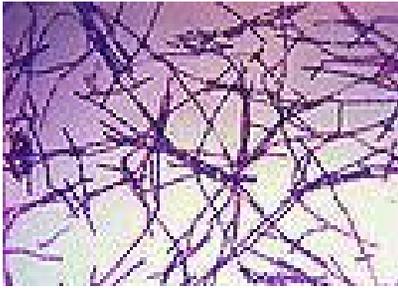
B. Escherichia coli



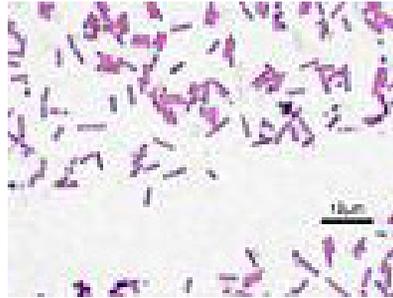
C. Staphylococcus aureus



D. Streptococcus mutans



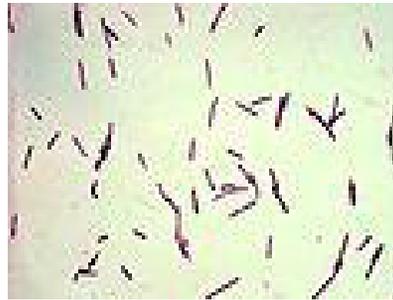
E. Bacillus anthracis



F. Bacillus subtilis



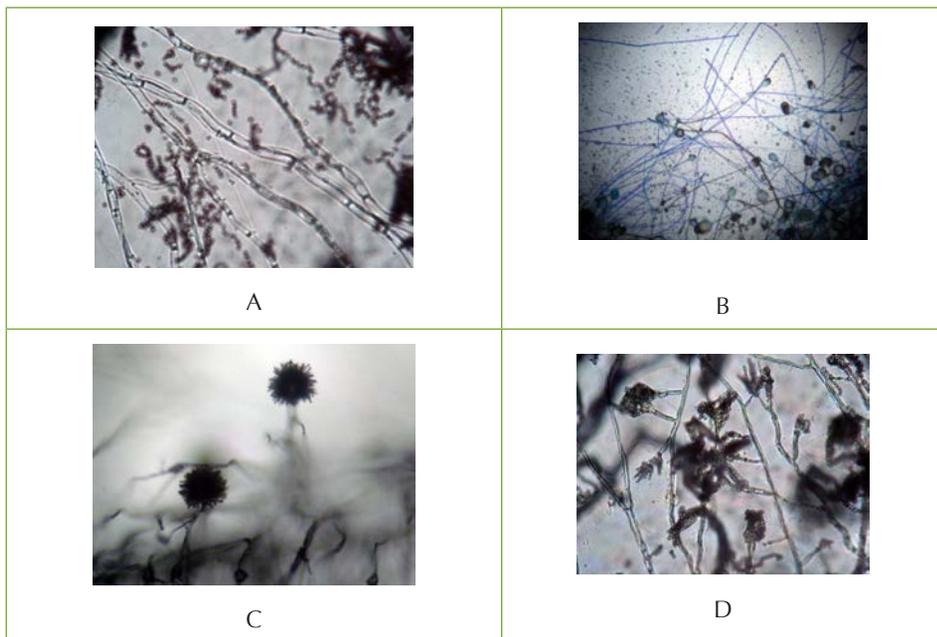
G. Bifidobacterium adolescentis



H. Clostridium perfringens

MICROSCOPIA DE FUNGOS

Figura 6. Hifas e corpos de frutificação de fungos filamentosos: A. hifas septadas; B. hifas cenocíticas ou não-septadas; C. cabeça conidial (*Aspergillus* sp); D. cabeça conidial (*Penicillium* sp); E. hifas cenocíticas e esporângio (*Rhizopus*); F. hifas e corpos de frutificação (*Fusarium* sp) (microscópio ótico, aumento de 40X). Laboratório de Microbiologia, DAQBI/UTFPR/.Fotos tiradas nas aulas práticas de Microbiologia.





E



F

Esta obra foi composta pela fonte Família Optima,
corpo 11 e em papel couche fosco 115g.