



INSTITUTO FEDERAL
Goiás

Apostila de técnicas básicas em Microbiologia (Cultivo, semeadura, identificação e crescimento)

*Ronney Fernandes Chagas
Patrícia Thieme Onofri Saiki*

*Coordenação de Biologia
Departamento II
IFG – Câmpus Goiânia*

SUMÁRIO

Orientações e conceitos gerais.....	3
Normas de biossegurança em Microbiologia	4
Normas de biossegurança na prática laboratorial.....	5
Materiais e equipamentos utilizados nas práticas	6
Termos e definições importantes	7
 Aula 1 – Preparo de meio de cultura e técnica de esterilização	10
Materiais e procedimentos.....	13
 Aula 2 – Obtenção de microrganismos do ambiente	15
Materiais e procedimentos.....	17
 Aula 3 – Técnicas de semeadura de microrganismos.....	19
Materiais e procedimentos.....	22
 Aula 4 – Análise de sensibilidade aos antimicrobianos.....	25
Materiais e procedimentos.....	27
 Aula 5 – Análise microscópica de microrganismos (técnicas básicas de microscopia.....	29
Materiais e procedimentos.....	32
 Aula 6 – Análise microscópica de microrganismos (células bacterianas)	33
Materiais e procedimentos.....	37
 Aula 7 – Análise microscópica de microrganismos (células fúngicas)	39
Materiais e procedimentos.....	42

Aula 8 – Análise microscópica de microrganismos (protozoários)

.....44

Materiais e procedimentos.....47

Aula 9 – Processos metabólicos celulares48

Materiais e procedimentos.....50

Análise de crescimento microbiano53

Aula 10 – Curva padrão de crescimento58

Aula 11 – Quantificação por espectrofotometria e unidade formadora
de colônias59

Aula 12 – Quantificação por microscopia61

ORIENTAÇÕES E CONCEITOS GERAIS

1- NORMAS DE BIOSSEGURANÇA EM MICROBIOLOGIA

A inocuidade das atividades realizadas com micro-organismos está vinculada principalmente às boas práticas laboratoriais, a organização do espaço de trabalho e do uso eficiente de equipamentos de segurança. As infecções associadas ao contato laboratorial na maioria das vezes não são identificadas com exatidão (agente e fonte de contaminação), diferente dos acidentes com agentes químicos, destacando a importância das normas de segurança neste ambiente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma classificação para os micro-organismos de acordo com os riscos que apresentam à saúde, além de normas internacionais sobre segurança nos laboratórios, e medidas de urgência nos casos de acidentes.

A classificação agrupa os microrganismos em 4 grupos distintos conforme o risco individual e comunitário, como segue:

Grupo de risco I (risco ausente ou muito baixo) apresentam baixas probabilidades de provocar doenças / moléstias humanas, e pouca importância veterinária. Ex. *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*.

Grupo de risco II (risco moderado) podem provocar infecção grave, entretanto existem medidas eficazes de tratamento e prevenção, limitando o risco de propagação entre os usuários do laboratório, comunidade, animais e meio ambiente. Ex. *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria meningitidis*.

Grupo de risco III (risco individual alto e limitado risco comunitário) provocam graves doenças humanas e veterinárias, podendo se propagar de indivíduo para indivíduo, porém existem medidas terapêuticas e de profilaxia. Ex. Vírus da Encefalite Equina Venezuelana, *Mycobacterium tuberculosis*, culturas de Vírus da Imunodeficiência Humana.

Grupo de risco IV (elevado risco individual e comunitário) são agentes infecciosos que se propagam facilmente direta e indiretamente. Ex. Vírus Marburg e Vírus Ebola.

Durante a disciplina de microbiologia você aprenderá os métodos apropriados para a manipulação de microrganismos pertencentes aos grupos que não apresentam riscos

efetivos à saúde. Todavia, toda cultura microbiana deve ser manuseada com respeito e com técnicas adequadas independente da classificação ou grupo de risco.

2- NORMAS DE BIOSSEGURANÇA NA PRÁTICA LABORATORIAL

As normas de segurança estipuladas para o laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Goiás têm como objetivo proteger a saúde dos servidores, alunos, comunidade acadêmica e meio ambiente dos possíveis riscos associados às práticas com microrganismos e materiais de experimentação biológica.

O contato e possíveis infecções podem ocorrer através das atividades rotineiras no laboratório. A pele, via respiratória e mucosa nasal, as vias digestivas e mucosa bucal, além dos olhos e ouvidos são as principais vias de contágio. As principais fontes de contato durante ações laboratoriais ocorrem por descuido e desatenção, e principalmente pela falta de técnica para o manuseio de materiais e equipamentos. A formação de aerossóis e respingos, injeções e descartes realizados de maneira errônea, pipetagens incorretas, além de trabalhos excessivos com grandes quantidades de materiais e pessoas no mesmo ambiente. Para evitar o risco de contaminação e propensão à possíveis infecções, todo indivíduo ao iniciar qualquer atividade dentro do laboratório de microbiologia deve seguir as normas estipuladas adiante:

- ✓ Use jaleco e sapato fechado (não use o jaleco fora do laboratório);
- ✓ Lave as mãos ao sair do laboratório;
- ✓ Mantenha o hábito de conservar as mãos longe da boca, nariz, olhos e mucosas durante a manipulação;
- ✓ Não manipule e nem armazene alimentos e cosméticos no laboratório;
- ✓ Estude o ambiente e familiarize-se com os equipamentos de segurança;
- ✓ Não pipete com a boca;
- ✓ Mantenha a organização e limpeza da bancada de trabalho. Mochilas e acessórios devem ser alocados em locais apropriados;
- ✓ A superfície de trabalho deve ser descontaminada com álcool 70% ou algum agente desinfetante antes e após o trabalho com microrganismo;
- ✓ Todo o material contaminado devem ser descontaminados/esterilizados antes do descarte ou reutilização;

- ✓ Materiais autoclavados ou incinerados devem ser acondicionados em recipientes fechados e impermeáveis;
- ✓ Não utilize tubos danificados, destampados ou rachados na centrífuga (tenha certeza do fechamento hermético para evitar o transbordamento do líquido);
- ✓ Somente pessoas autorizadas podem adentrar o laboratório;
- ✓ É direito a todos os usuários informações e instruções sobre os riscos e procedimentos. Usuários sem preparo ou autorização serão proibidos de utilizar o recinto;
- ✓ É vetada a entrada de crianças no laboratório;
- ✓ Notifique IMEDIATAMENTE o professor ou técnico de laboratório em caso de derramamentos, acidentes e exposições ao material infectante. O laboratório deve abrigar protocolos para estes episódios para avaliação, vigilância e profilaxia em eventos futuros.

3- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NAS PRÁTICAS

O preparo dos materiais e a manutenção da limpeza e assepsia durante as atividades laboratoriais garantem a confiabilidade dos dados obtidos. O conhecimento do controle microbiano visa prevenir a contaminação biológica do material de trabalho, a transmissão de doenças infecciosas, e deterioração microbiana com consequentes danos materiais.

Existem uma extensa gama de materiais e equipamentos utilizados em microbiologia. Os mais comuns são:

1- Vidrarias:

Utilizadas para mensurar e/ou armazenar meios de cultura e soluções químicas na rotina laboratorial.

- ✓ Placas de Petri;
- ✓ Erlenmeyer;
- ✓ Proveta;
- ✓ Balão volumétrico;
- ✓ Béquer;
- ✓ Pipetas graduadas;
- ✓ Bureta;
- ✓ Tubos de ensaio;



- ✓ Lâminas e lamínulas;
- ✓ Alça de Drigalski.

2- Autoclave:

Aparelho com fechamento hermético utilizado para esterilização. O princípio do equipamento consiste no aquecimento da água que mantida sob pressão não ferve, denominado esterilização por calor úmido.

3- Câmara de fluxo laminar

Equipamento que realiza a remoção das impurezas atmosféricas através de um filtro absoluto. O direcionamento do ar filtrado sobre a área de trabalho garante a manutenção da esterilidade.

4- Bico de Bunsen

Consiste numa base metálica e um bico de gás utilizado para flambagem, esterilização de materiais contaminados ou aquecimento de soluções.

Outros equipamentos de rotina incluem: balança analítica, agitador, contador de colônias, centrífuga, estufa de incubação, estufa de esterilização, refrigerador; entre outros.

4- TERMOS E DEFINIÇÕES IMPORTANTES

Antissepsia:

Medidas para o impedimento da proliferação de microrganismos em tecidos vivos através de agentes químicos (bactericidas ou bacteriostáticos) com objetivo terapêutico ou higiênico.

Desinfecção

Destruição de microrganismos infectantes em sua fase vegetativa (pouco mais sensível). É a mesma ideia da antissepsia, entretanto usado em materiais.

Soluções desinfetantes mais usadas em microbiologia:

Etanol 70%

Formol 10%

Hipoclorito 1%

Esterilização:

Processo pelo qual busca a redução máxima de microrganismos em sua forma mais resistente (esporos) principalmente através de calor ou por pressão de vapor. Existem várias técnicas de esterilização, sendo a autoclavagem a mais usada.

Esterilização por calor úmido (autoclavagem):

O funcionamento da autoclave é semelhante ao da panela de pressão, no qual a água ferve sob pressão. O calor úmido inativa as bactérias por desnaturação das proteínas e ácidos nucleicos. A eficiência do processo com calor úmido ocorre pela maior eficiência do vapor de água de penetrar e romper as pontes de hidrogênio. As variáveis com maior eficiência para esterilização de materiais e meios de cultura são: 1 atm e 121°C por 15/30 minutos.

Esterilização com calor seco:

A esterilização a seco ocorre pela exposição prolongada dos materiais em estufa de altas temperaturas, fornos e até mesmo na chama do bico de Bunsen. A esterilização pode ocorrer mantendo o material sobre a chama até tornar-se incandescente ou rubro (incineração), como o caso de pinças e agulhas de inoculação ou utilizando-se de produtos inflamáveis (flambagem).

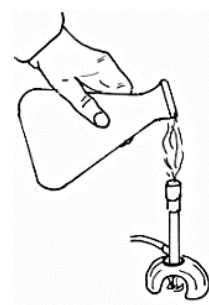
Incineração:

A incineração objetiva a eliminação de microrganismos por contato direto com uma fonte de calor seco (chama). Pode-se utilizar fornos de incineração ou até mesmo a chama produzida pelo bico de Bunsen.



Flambagem:

Variação do processo de incineração, porém utilizada para situações onde o material não pode ter contato direto com a fonte de calor seco, para isso, geralmente embebe-se o material previamente em álcool e rapidamente aproximá-lo da chama, esperando o álcool alimentar o fogo gerado.



Meios de cultura:

Os meios de cultura são compostos nutritivos que atendem as exigências nutricionais das espécies cultivadas. Estes compostos podem ser sintéticos e quimicamente definidos ou complexos, como sangue e extrato de carne. O estado físico pode variar de líquidos (caldo), semissólidos e sólidos. Os meios de cultura mais usados em microbiologia são disponibilizados comercialmente na forma desidratada, e são preparados com a pesagem do pó e homogeneização com água destilada (quantidade especificada no rótulo). O frasco em meia rosca ou fechado com tampão de algodão deve ser autoclavados.

AULA 1

PREPARO DE MEIOS DE CULTURA E TÉCNICA DE ESTERILIZAÇÃO

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura são compostos nutritivos que atendem as exigências nutricionais das espécies cultivadas. Estes compostos podem ser sintéticos e quimicamente definidos ou complexos, como sangue e extrato de carne. O estado físico pode variar de líquidos – caldos – sem elementos de solidificação, semissólidos – com uma concentração baixa de elementos de solidificação e sólidos – com maior concentração de elementos de solidificação.

Tipos de meios de cultura de acordo com suas funções



- Meio de enriquecimento: rico em nutrientes, geralmente líquido, utilizado com a finalidade de aumentar a concentração de microrganismos da amostra analisada.
- Meio de Transporte: isento de nutrientes e contendo um agente redutor (tioglicolato ou cisteína) esse meio de cultura tem a finalidade de manter o pH favorável, prevenir a desidratação dos microrganismos e evitar a oxidação e a ação enzimática destrutiva durante o transporte.
- Meio Seletivo: com a adição de corantes específicos, antibióticos ou outras substâncias com capacidade inibitória, estes meios de cultura têm como finalidade impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis para selecionar e isolar a espécie ou grupo de microrganismos desejados.

- Meio diferencial: apresentam substâncias que permitem a distinção presuntiva de gêneros e espécies devido alterações na cor e/ou morfologia das colônias.
- Meio indicador: tem como função de evidenciar as propriedades bioquímicas dos microrganismos, facilitando a identificação.

Preparo de meios de cultura

Os diferentes tipos de meio de cultura podem exigir técnicas diferenciadas para o preparo. Os meios de cultura mais usados em microbiologia são disponibilizados comercialmente na forma desidratada, e são preparados com a pesagem do pó de meio de cultura e posteriormente homogeneizados com água destilada (quantidade especificada no rótulo), sendo posteriormente fechados com roscas, rolhas ou tampão de algodão.

Obs: Meios de cultura contendo ágar devem ser fervidos e solubilizados até a obtenção de uma solução homogênea e translúcida, antes de serem levados à autoclave.

Esterilização por autoclavagem

Para completa esterilização, os meios preparados, devem ser autoclavados a 120°C por 20 minutos e 1 atm de pressão.

A autoclavagem é um método de esterilização essencial, baseado na ação do vapor saturado sob pressão, e compreende três etapas principais: a Fase de Aquecimento e Remoção de Ar (Condicionamento), onde o ar é removido da câmara (por gravidade ou pré-vácuo) e a temperatura é elevada para garantir a penetração uniforme do vapor; a Fase de Esterilização (Exposição), na qual o material é mantido sob a temperatura e pressão necessárias pelo tempo determinado para a completa destruição de microrganismos, incluindo esporos; e a Fase de Exaustão e Secagem, onde o vapor é liberado e os materiais são secos através de vácuo ou aquecimento, preparando-os para remoção e armazenamento asséptico.

Obs: Alguns meios requerem o enriquecimento com substâncias termolábeis (sensíveis a temperaturas elevadas). Neste caso, os constituintes termorresistentes seguem a autoclavagem normal, enquanto que os componentes termolábeis são filtrados em membrana filtrante (nitrocelulose e acetato de celulose) e adicionados ao meio de cultura já estéril a temperaturas ambiente.

AULA PRÁTICA 1

PREPARO DE MEIOS DE CULTURA E AUTOCLAVAGEM

Objetivo da aula:

Avaliar os procedimentos laboratoriais relacionados a produção de diferentes meios de cultura, a maneira correta de estocá-los e submissão dos mesmos a processos de esterilização por autoclavagem.

Materiais:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| ✓ Água destilada; | ✓ Becker; |
| ✓ Balança; | ✓ Erlenmeyer; |
| ✓ Proveta; | ✓ pHmetro e soluções de ajuste de pH; |
| ✓ Bastão de vidro ou agitador magnético; | ✓ Papel parto e algodão; |
| ✓ Meio de cultura comercial; | ✓ Autoclave. |

Procedimentos

- ✓ Pesar o meio de cultura comercial de acordo com as especificações do fabricante com relação a massa necessária para o volume de meio que se deseja e colocar o material em um Becker.
- ✓ Com auxílio da proveta, medir a metade do volume de água para preparo da solução e dissolver o meio previamente pesado no Becker. Para auxílio no processo de dissolução, utilizar o bastão de vidro ou o agitador magnético.
- ✓ Após completa dissolução, novamente com uma proveta, completar o volume de água para a quantidade total de meio a ser preparado (observar o menisco da solução).
- ✓ Transferir a solução para um erlenmeyer e lacrar o frasco com um tampão de algodão, coberto com papel.

Obs: Utilizar um erlenmeyer com uma capacidade total de estoque duas vezes maior que o volume total de meio que será armazenado nele. Ex: preparo de 500 mL de meio de cultura, utilizar um erlenmeyer com capacidade total de 1L.

- ✓ Rotular o frasco com o nome do meio, data e responsável pela produção.
- ✓ Adicionar o meio preparado, lacrado e rotulado na autoclave e aguardar o ciclo completo de esterilização e posterior resfriamento para retirada do meio.
- ✓ Armazenar o meio em sistema refrigerado (4°C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA 2

OBTENÇÃO DE MICRORGANISMOS DO AMBIENTE

UBIQUIDADE DOS MICRORGANISMOS

A ubiquidade dos microrganismos é a característica que define sua capacidade de existir e se desenvolver em praticamente todos os ambientes da Terra, habitando nichos extremamente diversos, desde solos profundos, águas termais ácidas, geleiras polares, até o ar que respiramos e o interior de outros seres vivos. Essa distribuição ampla é possível devido ao seu tamanho microscópico, à sua rápida taxa de reprodução e à notável flexibilidade metabólica, que lhes permite utilizar uma vasta gama de fontes de energia e nutrientes.

Assim, apesar de invisíveis a olho nu, os microrganismos (como bactérias, fungos e vírus) formam a base dos ecossistemas globais, desempenhando papéis cruciais no ciclo de nutrientes, na decomposição da matéria orgânica e na manutenção da saúde de plantas e animais.

Além de sua presença em todos os ambientes externos, os microrganismos mantêm uma relação íntima e constante com nosso próprio corpo, formando a microbiota humana (interna e externa), constituída por trilhões de bactérias, fungos, vírus.

A microbiota interna é essencialmente encontrada no trato gastrointestinal (especialmente no intestino grosso), onde desempenha funções vitais como a digestão de carboidratos complexos que não conseguimos processar, a produção de vitaminas essenciais (como a K e algumas do complexo B) e a educação e modulação do sistema imunológico.

Já a microbiota externa envolve a pele, as vias aéreas superiores e diversas mucosas. Na pele, por exemplo, esses microrganismos atuam como uma barreira de defesa, ocupando o espaço e competindo com patógenos invasores, o que é um fator crucial na proteção contra infecções.

AULA PRÁTICA 2

OBTENÇÃO DE MICRORGANISMOS DO AMBIENTE

Objetivo da aula:

Analisar estratégias de obtenção de microrganismos do ambiente, avaliar a sua ampla distribuição e visualizar como podemos observar sua presença, macroscopicamente, através das colônias de culturas.

Materiais:

- ✓ Meio de cultura;
- ✓ Proveta;
- ✓ Placas de petri;
- ✓ Swab ou cotonete;
- ✓ Estufa de crescimento.

Procedimentos

Obtenção de microrganismos suspensos no ar

- ✓ Adicionar aproximadamente 20 mL de meio de cultura sólido, ainda em consistência líquida, em placas de petri e aguardar até a completa solidificação.
- ✓ Separar duas placas com meio já solidificado e posicioná-las abertas em diferentes pontos do laboratório.
- ✓ Cronometrar 15 min de exposição para uma das placas e 30 minutos para a outra placa.

Obtenção de microrganismos presentes em superfície

- ✓ Adicionar aproximadamente 20 mL de meio de cultura sólido, ainda em consistência líquida, em placas de petri e aguardar até a completa solidificação.
- ✓ Com o auxílio de um swab ou cotonete, previamente umidificado em água, friccionar a parte do algodão em alguma superfície do ambiente laboratorial (bancada, piso, maçaneta da porta, tela do celular etc.)
- ✓ Com essa extremidade do swab que foi friccionada, realizar movimentos em ziguezague na superfície do meio de cultura.

Obtenção de microrganismos presentes na microbiota

- ✓ Adicionar aproximadamente 20 mL de meio de cultura sólido, ainda em consistência líquida, em placas de petri e aguardar até a completa solidificação.
- ✓ Com o auxílio de um swab ou cotonete, previamente umidificado em água, friccionar a parte interna da boca ou garganta.
- ✓ Com essa extremidade do swab que foi friccionada, realizar movimentos em ziguezague na superfície do meio de cultura.
- ✓ Com outra placa de petri, posicione seu polegar na parte superficial do meio, garantindo que todo o dedo encoste na superfície.

Obs 1: Após a realização de todos os procedimentos acima, colocar as placas em estufa de cultura à 30 °C por 24 a 48 hs.

Obs 2: Visualizar as colônias de microrganismos formadas após o crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA 3

Técnicas de semeadura de microrganismos (Tubos de ensaio e placas)

TÉCNICAS DE CULTIVO E SEMEADURA DE MICRORGANISMOS

A semeadura de microrganismos é o processo técnico de transferir uma amostra biológica (inóculo) para um meio de cultura estéril, com o objetivo de promover o crescimento e o desenvolvimento microbiano em condições controladas em laboratório. O procedimento é realizado sob rigorosas condições de assepsia, geralmente em torno da chama de um bico de Bunsen ou em cabines de segurança biológica e a semeadura pode utilizar diferentes instrumentos, como alças de platina, agulhas ou swabs, utilizando diversas técnicas, como o esgotamento por estrias ou o espalhamento em superfície. Essas variações técnicas são fundamentais para permitir desde o crescimento em massa para estudos metabólicos até o isolamento de colônias puras, etapa essencial para a identificação morfológica, bioquímica e genética do microrganismo em estudo.

CULTIVO EM TUBO DE ENSAIO

As técnicas de semeadura em tubos de ensaio são fundamentais na microbiologia para o isolamento, conservação e observação do comportamento metabólico de microrganismos.

No estriamento em tubo inclinado (meio sólido), o inóculo é espalhado em zigue-zague sobre a superfície inclinada do ágar, sendo ideal para aumentar a biomassa ou preservar culturas puras por longos períodos.

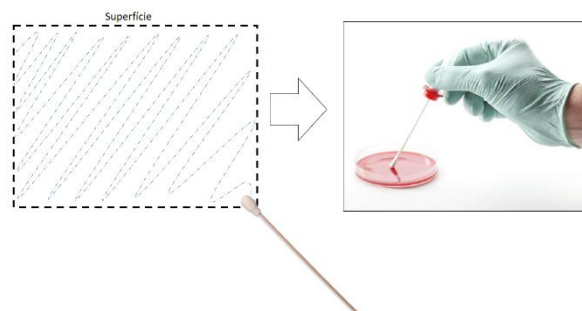
Já a picada central em camada alta consiste em introduzir uma agulha de inoculação verticalmente até o fundo de um tubo com ágar semi-sólido, permitindo avaliar a motilidade bacteriana (presença de turbidez fora da linha de picada) e o potencial de microrganismos em realizar reações de fermentação.

A difusão em meio líquido (caldo nutritivo) ocorre através da simples transferência do inóculo para o líquido, o que facilita o crescimento rápido e a observação de características como a formação de películas superficiais, sedimentos no fundo ou turbidez uniforme em toda a extensão do meio.

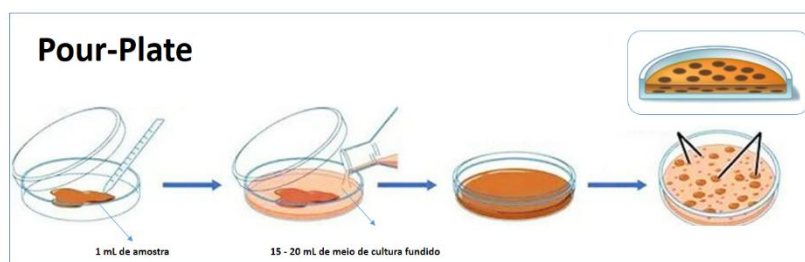
CULTIVO EM PLACA DE PETRI

As técnicas de semeadura em placas de Petri são essenciais para o isolamento e a quantificação de microrganismos, cada uma servindo a um propósito específico no laboratório.

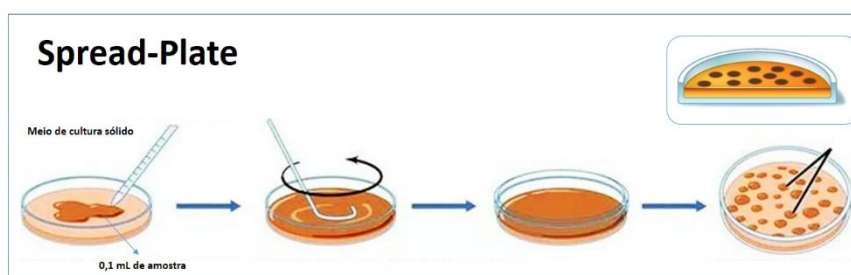
O esgotamento por estriamento é a técnica mais utilizada para obter colônias isoladas a partir de uma amostra mista. Utilizando uma alça de inoculação, o microrganismo é espalhado em setores sucessivos na superfície do ágar sólido; a cada novo setor, a alça é esterilizada, arrastando cada vez menos células até que, ao final do procedimento, elas fiquem distantes o suficiente para crescerem como colônias puras e isoladas.



A inoculação por pour plate (inoculação em profundidade) o inóculo é depositado no fundo da placa vazia e, em seguida, o meio de cultura fundido (e resfriado a cerca de 45°C) é vertido por cima. Após a solidificação e incubação, as colônias crescem tanto na superfície quanto no interior do ágar, sendo um método excelente para a contagem de microrganismos viáveis e para o isolamento de anaeróbios facultativos.



Já a inoculação por spread plate (espalhamento em superfície) consiste em depositar um volume conhecido de amostra líquida no centro de uma placa com ágar já solidificado. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, a amostra é espalhada uniformemente por toda a superfície. É a técnica padrão para quantificação por unidades formadoras de colônia quando se deseja que todas as colônias cresçam exclusivamente na superfície, facilitando a visualização e a contagem.



AULA PRÁTICA 3

TÉCNICAS DE SEMEADURA DE MICRORGANISMOS

Objetivo da aula:

Avaliar diferentes técnicas de inoculação de microrganismos em meio de cultura presentes em tubos de ensaio e em placas de petri.

Materiais:

- ✓ Meio de cultura;
- ✓ Tubo de ensaio;
- ✓ Placas de petri;
- ✓ Alça e agulha de platina
- ✓ Bico de Bunsen;
- ✓ Alça de Drigalski;
- ✓ Estufa de crescimento.

Procedimentos

Cultivo em tubos de ensaio

1- Cultivo em meio sólido em tubo inclinado

- ✓ Adicionar aproximadamente 5 mL de meio de cultura sólido, ainda em consistência líquida, em tubos de ensaio estéreis. Posicionar o tubo em uma superfície inclinada e aguardar até a completa solidificação.
- ✓ Com auxílio da alça de platina, pegar uma porção do inóculo (cultura previamente preparada) e realizar os movimentos de estriamento, do fundo do tubo para a abertura do mesmo.

2- Cultivo em meio sólido em tubo de camada alta

- ✓ Adicionar aproximadamente 5 mL de meio de cultura sólido, ainda em consistência líquida, em tubos de ensaio estéreis. Posicionar o tubo em uma posição vertical e aguardar até a completa solidificação.
- ✓ Com auxílio da agulha de platina, pegar uma porção do inóculo (cultura previamente preparada) e perfurar a parte central do meio até o fundo do tubo.

3- Cultivo em meio líquido

- ✓ Adicionar aproximadamente 5 mL de meio de cultura em tubos de ensaio estéreis.

- ✓ Com auxílio da alça de platina, pegar uma porção do inóculo (cultura previamente preparada) e mergulhar a alça no meio líquido.

Cultivo em placas de petri

1- Semeadura por estriamentos múltiplos

- ✓ Demarcar o fundo da placa com desenho de cruz, definindo 4 quadrantes.
- ✓ Transferir uma alçada do inóculo para a placa de meio sólido e estriá-la em zig-zag no primeiro quadrante da placa.
- ✓ Aproximar a ponta da alça na chama do bico de Bunsen e aguardar resfriamento.
- ✓ Friccionar a alça na região final do estriamento do primeiro quadrante e arrastar, promovendo o estriamento no segundo quadrante.
- ✓ Repetir esse processo até estriar todos os quadrantes da placa.

2- Semeadura por spread plate (espalhamento em superfície)

- ✓ Com auxílio de uma pipeta, inocular 10^8 células/mL da amostra na superfície do meio de cultura já solidificado previamente.
- ✓ Utilizando a alça de Drigalski espalhar o conteúdo pela superfície do meio de cultura até a completa cobertura.

3- Semeadura por pour plate (espalhamento em profundidade)

- ✓ Com auxílio de uma pipeta, inocular 10^8 células/mL da amostra em uma placa esterilizada, porém vazia.
- ✓ Em seguida adicionar 15-20 mL de meio de cultura ainda fundido (45 a 50°C), acima do inóculo presente na placa vazia.
- ✓ Homogeneizar o meio através de movimentos rotativos suaves na placa de Petri sobre uma superfície lisa.

Obs: Após a realização de todos os procedimentos acima, colocar as placas em estufa de cultura à 30 °C por 24 a 48 hs. Visualizar as colônias de microrganismos formadas após o crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA 4

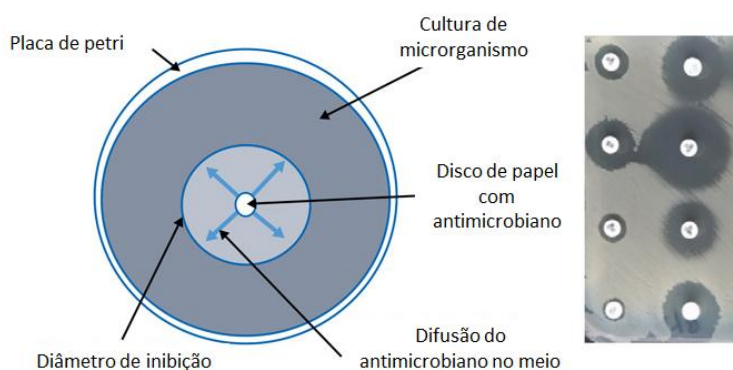
ANÁLISE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TESTE DE DISCO DIFUSÃO)

ANTRIMICROBIANOS E TESTE DE SENSIBILIDADE

Os antimicrobianos são uma classe de substâncias que inclui antibióticos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários. Seu principal mecanismo de ação é eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, sendo ferramentas cruciais na medicina, veterinária e agricultura, para o tratamento de diversas infecções.

A aplicação de estudos de desenvolvimento de novos antimicrobianos, vem ganhando cada vez mais destaque em diversas áreas, como medicina, farmacologia, indústria alimentícia e de conservação de alimentos.

Um método amplamente empregado para avaliação do potencial antimicrobiano de uma substância é o método de disco-difusão, também conhecido como Teste de Kirby-Bauer, é uma técnica qualitativa que consiste em semear uniformemente o microrganismo testado sobre a superfície de uma placa contendo o meio ágar Mueller-Hinton e em seguida, adicionar pequenos discos de papel de filtro, impregnados com uma concentração conhecida do antimicrobiano, sobre a superfície do ágar. O antimicrobiano se difunde radialmente para o meio criando um gradiente de concentração. Se o microrganismo for sensível ao agente, seu crescimento será inibido em torno do disco, formando um halo de inibição. A medição do diâmetro desse halo é comparada com tabelas padronizadas, possibilitando a classificação do microrganismo como: sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R).



AULA PRÁTICA 4

ANÁLISE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Objetivo da aula:

Avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes produtos químicos de ação desinfetante, antisséptica e esterilizante, utilizando o teste de disco em difusão.

Materiais:

- ✓ Culturas de células padronizadas;
- ✓ Placas com meio Ágar padrão;
- ✓ Discos de papel filtro estéril;
- ✓ Antimicrobianos testados;
- ✓ Alça de Drigalski;
- ✓ Pinça estéril;
- ✓ Régua ou paquímetro.

Procedimentos

- ✓ Preparar as placas adicionando o meio de cultura e aguardando a solidificação;
- ✓ Adicione 0,1 mL da cultura de células padronizadas e com a alça de Drigalski, espalhe a cultura por toda a superfície (semeadura por spread-plate);
- ✓ Em seguida, com auxílio de uma pinça estéril, umedeça os discos com a solução dos antimicrobianos e coloque-os sobre o meio com o microrganismo, de forma que os discos fiquem equidistantes na placa;

Obs: Para o **controle negativo**, umedeça o disco com água destilada estéril.

- ✓ Repita o procedimento para todos os antimicrobianos;
- ✓ Incubar por 48 h a 30°C;
- ✓ Em seguida avaliar a inibição medindo o halo transparente gerado (em caso de resultado positivo para inibição) com um paquímetro ou régua.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA 5

ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMOS (PARTE I - TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROSCOPIA)

MICROSCOPIA

O microscópio óptico, também conhecido como microscópio de luz, é um instrumento utilizado para ampliar imagens para fins de observação. Dotado de um conjunto de lentes convergentes, alguns modelos apresentam lentes suficientemente poderosas que garantem a perfeita nitidez em observações de estruturas infimamente minúsculas. Os microscópios ópticos comuns permitem a ampliação máxima da imagem até 1000 vezes.

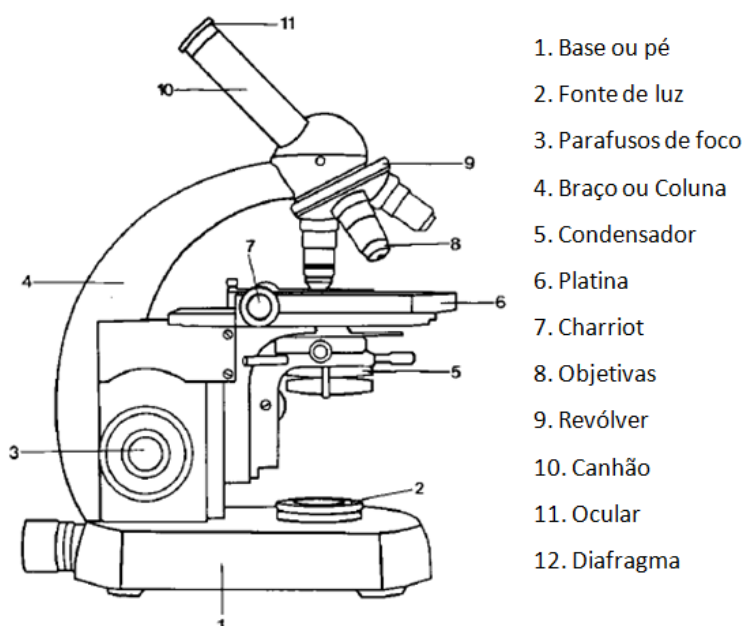
Para garantir a melhor imagem a luz é essencial, ela deve atravessar a amostra para evidenciar as estruturas. O conjunto de lentes objetivas e oculares são responsáveis por aumentar e levar a imagem para o campo de visão do observador.

A estrutura do microscópio consiste em partes mecânicas que conferem suporte e estabilidade, e partes ópticas que atuam na formação da imagem. Dentre os elementos **mecânicos** do microscópio temos.

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ✓ Base ou pé; | ✓ Charriot; |
| ✓ Parafusos macro e micrométrico; | ✓ Presilha; |
| ✓ Haste ou braço; | ✓ Tambor ou revólver das objetivas; |
| ✓ Mesa ou platina; | ✓ Canhão. |

Já a parte **óptica** é composta por:

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| ✓ Fonte de iluminação; | ✓ Lentes oculares; |
| ✓ Botão do condensador; | ✓ Lentes objetivas. |
| ✓ Diafragma; | |



Para realizar a focagem correta em um microscópio óptico, o processo deve iniciar-se pela preparação da platina, onde a lâmina é fixada firmemente com as pinças do charriot e a amostra é centralizada sobre o feixe de luz.

É fundamental sempre começar a observação pela objetiva de menor aumento, geralmente a de 4x, pois elas oferecem um campo de visão mais amplo e maior segurança contra colisões.

Olhando por fora do aparelho, utiliza-se o parafuso macrométrico para elevar a platina até que a lâmina fique próxima à lente; em seguida, olhando pelas oculares, gira-se o macrométrico no sentido inverso, afastando a lâmina lentamente até que o esboço da imagem apareça, finalizando o ajuste de nitidez exclusivamente com o parafuso micrométrico.

Ao transitar para aumentos maiores, como a objetiva de 40x, deve-se girar o revólver até que a lente desejada se posicione. Nesta etapa, é crucial nunca utilizar o parafuso macrométrico, pois a proximidade entre a lente e o vidro da lâmina é mínima, e qualquer movimento brusco pode resultar na quebra do material ou danos à lente; portanto, utiliza-se apenas o parafuso micrométrico para estabilizar o foco. É comum que a imagem escureça conforme o aumento cresce, sendo necessário reajustar a abertura do diafragma ou a intensidade da fonte luminosa para manter a clareza visual.

Para a observação detalhada com a objetiva de imersão de 100x, o procedimento exige a aplicação de uma gota de óleo de imersão diretamente sobre a área da amostra na lâmina, com o revólver posicionado entre a lente de 40x e a de 100x. Após posicionar a objetiva de 100x no óleo, realize o ajuste fino com o micrométrico.

Ao concluir o trabalho, a limpeza imediata da lente de imersão e das demais partes que tiveram contato com o óleo é obrigatória, utilizando papel de seda macio e solução específica para evitar o ressecamento do resíduo, o que preserva a integridade da óptica e garante a precisão das futuras análises.

AULA PRÁTICA 5

ANÁLISE DE CÉLULAS UTILIZANDO O MICROSCÓPIO

Objetivo da aula:

- Identificar os elementos que compõe o microscópio, evidenciando suas funções para aumento das amostras biológicas.
- Desenvolver habilidades para manuseio, focalização e interpretação de imagens microscópicas.

Materiais:

- ✓ Microscópio;
- ✓ Lâmina;
- ✓ Lamínula;
- ✓ Óleo de imersão.

Procedimentos

- ✓ Adicionar a amostra biológica a ser analisada no centro da lâmina e cobri-la com a lamínula.
- ✓ Posicionar a lâmina platina e realizar as etapas de focagem com a objetiva de 4x.
- ✓ Visualizada a imagem de forma nítida proceder o aumento para as objetivas de 10x e posteriormente de 40x.
- ✓ Antes de mudar para a objetiva de 100x, adicionar uma gota de óleo de imersão acima da lamínula.
- ✓ Gire o revólver para a objetiva de 100x e visualize a imagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

AULA 6

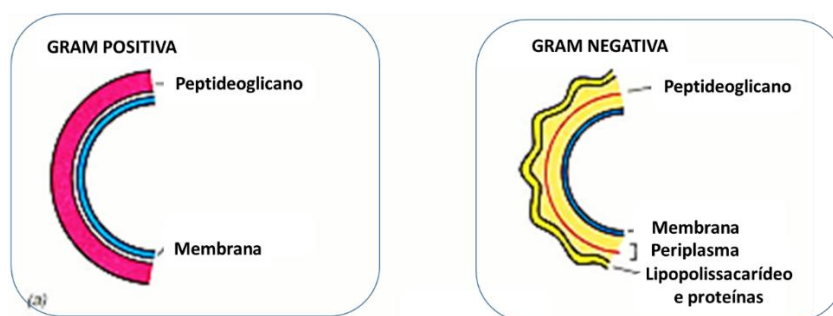
ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMOS (PARTE II – CÉLULAS BACTERIANAS)

PAREDE CELULAR BACTERIANA

A parede celular bacteriana é uma estrutura fundamental para a manutenção da forma celular e para a proteção contra a lise osmótica, sendo composta primordialmente por uma rede de polímeros conhecida como peptidoglicano.

A principal diferenciação entre as bactérias ocorre através da coloração de Gram, que as divide em dois grandes grupos baseados na arquitetura dessa parede.

As bactérias **Gram-positivas** possuem uma camada espessa e multiestratificada de peptidoglicano associada a ácidos teicoicos, que conferem estabilidade e carga negativa à estrutura. Em contraste, as bactérias **Gram-negativas** apresentam uma camada de peptidoglicano significativamente mais fina, localizada no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e uma membrana externa complexa; esta membrana externa é rica em lipopolissacarídeos (LPS), que atuam como endotoxinas e barreira seletiva contra diversos antibióticos e agentes químicos.

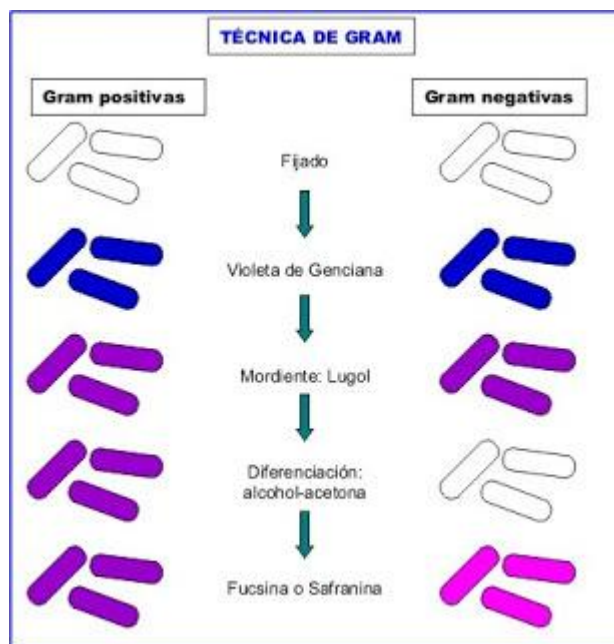


COLORAÇÃO GRAM

A técnica de coloração de Gram é um método de coloração diferencial fundamental na microbiologia, pois permite distinguir os dois principais grupos de bactérias com base na composição química e estrutural de suas paredes celulares.

O processo envolve o uso sucessivo de um corante primário (cristal violeta), um mordente (lugol), um agente descolorante (álcool ou acetona) e um corante de contraste (safranina ou fucsina).

O diferencial reside na resposta das células ao descolorante: nas bactérias Gram-positivas, a espessa camada de peptidoglicano se desidrata e retrai na presença do álcool, retendo o complexo cristal violeta-iodo em seu interior e mantendo a coloração roxa; por outro lado, nas bactérias Gram-negativas, a camada de peptidoglicano é fina e a membrana externa rica em lipídios é solubilizada pelo álcool, aumentando a permeabilidade e permitindo que o corante primário seja removido, o que faz com que estas células aceitem o corante de contraste e apresentem uma cor vermelha ou rosa.



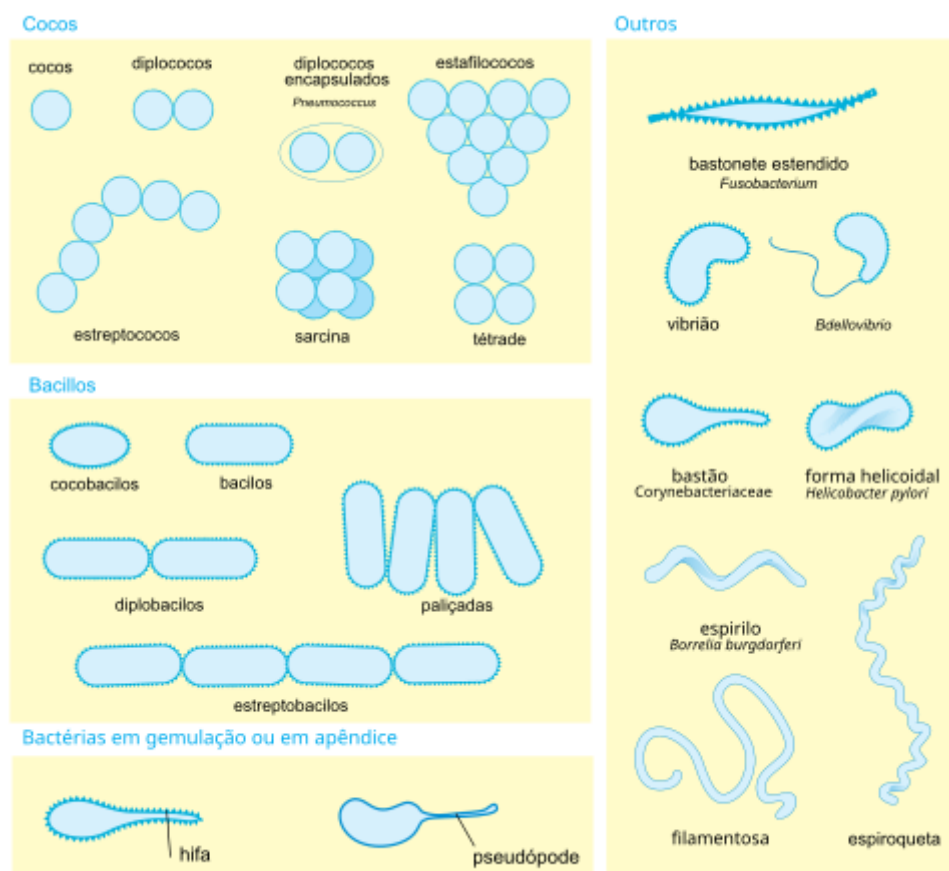
MORFOLOGIA CELULAR BACTERIANA

Embora sejam organismos unicelulares extremamente pequenos, as bactérias apresentam uma diversidade morfológica notável, sendo as três formas fundamentais os cocos (esféricos ou ovalados), os bacilos (bastonetes alongados) e as formas espiraladas. Dentro do grupo das espiraladas, encontramos ainda subdivisões importantes: os vibriões, que possuem formato de vírgula; os espirilos, que têm corpo rígido e ondulado; e as espiroquetas, que apresentam uma forma helicoidal flexível.

Além da forma individual, a maneira como as células permanecem unidas após a divisão celular determina o seu arranjo, o que é particularmente distintivo entre os cocos. Quando os cocos se dividem e permanecem em pares, são chamados de diplococos; quando formam cadeias semelhantes a colares, são denominados estreptococos. Divisões em dois

planos formam grupos de quatro células chamados tétrades, enquanto divisões em três planos de forma organizada resultam em cubos de oito células conhecidos como sarcinas. Já os estafilococos formam agrupamentos irregulares que lembram cachos de uvas, resultantes de divisões em múltiplos planos aleatórios.

No caso dos bacilos, a diversidade de arranjos é menor, pois eles se dividem apenas em seu eixo transversal. Eles podem ser encontrados como células isoladas, em pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos). Alguns bacilos curtos e arredondados podem ser confundidos com cocos, recebendo o nome de cocobacilos.



AULA PRÁTICA 6

ANÁLISE CELULAR DE BACTÉRIAS

Objetivo da aula:

Avaliar a morfologia celular bacteriana observando as diferenças de parede celular e forma de célula utilizando a técnica de coloração Gram.

Materiais:

- ✓ Colônias isoladas de bactérias;
- ✓ Corantes: Lugol, Cristal Violeta e Fucsina;
- ✓ Solução descorante: álcool-acetona;
- ✓ Microscópio
- ✓ Alça de Inoculação;
- ✓ Bico de Bunsen;
- ✓ Lâminas e lamínulas;
- ✓ Papel absorvente;
- ✓ Pinça;
- ✓ Cronômetro.

Procedimentos

1- Fixação da amostra bacteriana na lâmina

- ✓ Coloque uma gota de água sobre a lâmina;
- ✓ Colete uma alçada da colônia e faça movimentos de rotação sobre a água para se obter um esfregão de forma oval, bem fino e uniforme;
- ✓ Segurando a lâmina com a pinça, passa-a diversas vezes sobre o fogo do bico de Bunsen até a completa evaporação da água.

ATENÇÃO: não permaneça com a lâmina sobre a chama por há o risco de trincar e quebrar!

2- Técnicas de coloração

Com a amostra bacteriana já fixada na lâmina, coloque-a no suporte e siga os passos a seguir:

- ✓ Coloque o corante CRISTAL VIOLETA sobre o esfregão da bactéria e deixe por 1 minuto.
- ✓ Remova o corante e lave rapidamente com água (use a pisseta).

- ✓ Coloque o corante LUGOL sobre o esfregaço e deixe por 1 minuto.
- ✓ Lave novamente com água.
- ✓ Despeje continuamente a solução de Álcool-Acetona sobre o esfregaço durante 20 segundos (utilize a pisseta com a solução).
- ✓ Lave com água para remover a solução da lâmina.
- ✓ Cubra o esfregaço com FUCSINA (contra-corante) e deixe em repouso por 30 segundos.
- ✓ Remova o excedente de corante com água, deixe secar e examine ao microscópio (sob imersão – aumento de 100x na objetiva).
- ✓ Visualizar as diferentes paredes e morfologias celulares observadas na amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA 7

ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMOS (PARTE III– CÉLULAS FÚNGICAS)

ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos que podem ser unicelulares ou pluricelulares, distinguindo-se fundamentalmente por possuírem uma parede celular rígida composta de quitina, um polissacarídeo que lhes confere proteção e suporte estrutural.

Diferentemente das plantas, os fungos são heterotróficos por absorção, o que significa que secretam enzimas digestivas no ambiente para decompor matéria orgânica e absorver os nutrientes resultantes. Internamente, suas células apresentam todas as organelas típicas de eucariontes, como núcleo definido, mitocôndrias e complexo de Golgi, além de armazenarem energia na forma de glicogênio, uma característica bioquímica que os aproxima mais dos animais do que dos vegetais.

Na morfologia fúngica, existem dois tipos principais de organização: as leveduras e os fungos filamentosos (ou miceliais).

As leveduras são organismos unicelulares, geralmente de formato esférico ou oval, que se reproduzem de forma assexuada principalmente por brotamento (Figura 1A).

Já os fungos filamentosos são multicelulares e crescem através de estruturas tubulares e ramificadas denominadas hifas. O conjunto emaranhado dessas hifas forma o micélio, que se divide em micélio vegetativo (função de absorção de nutrientes e fixação no substrato) e micélio reprodutor (função reprodutiva) (Figura 1B).

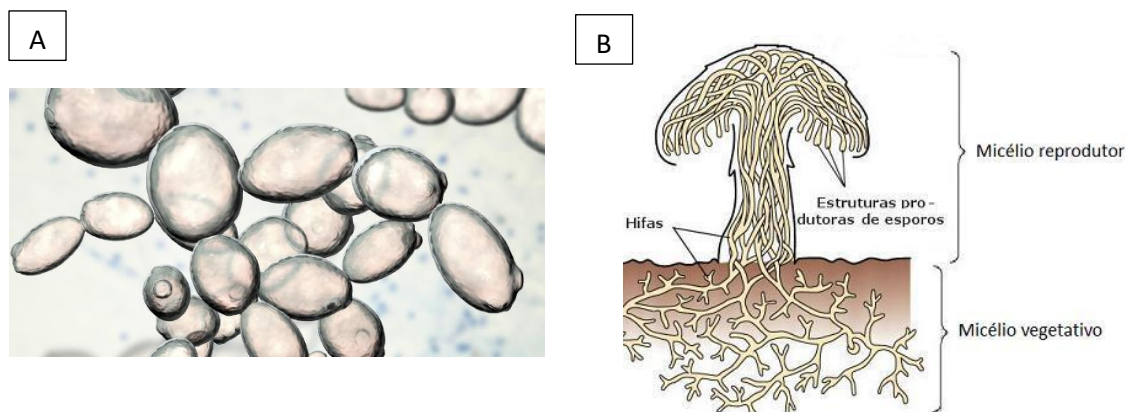
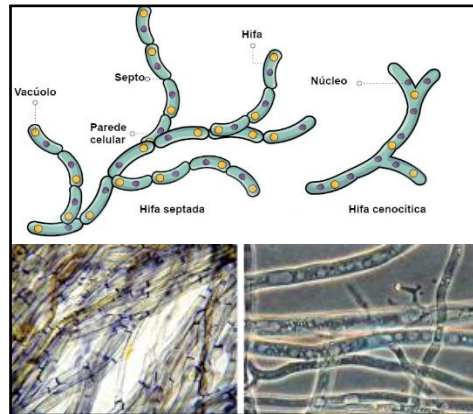


Figura 1 – Tipos morfológicos fúngicos. (A) Levedura e (B) Micélio.

As hifas que compõem os micélios são classificadas de acordo com a presença de divisões internas: as hifas septadas possuem paredes transversais (septos) que delimitam as células, embora contenham poros para a passagem de citoplasma e organelas, enquanto as hifas cenocíticas (ou asseptadas) não possuem essas divisões, formando um tubo citoplasmático contínuo com diversos núcleos.



A reprodução assexuada dos micélios é um processo altamente eficiente fundamentado na produção de esporos, que variam significativamente em sua estrutura de proteção e dispersão.

Os esporangiósporos caracterizam-se por serem produzidos internamente em uma estrutura sacular denominada esporângio, localizada na extremidade de uma hifa especializada (esporangióforo); por serem formados dentro dessa bolsa, permanecem protegidos até que a parede do esporângio se rompa para liberá-los (Figura 2A).

Em contrapartida, os conidiósporos (ou conídios) são esporos exógenos, o que significa que são produzidos externamente, sem qualquer membrana envolvente, nas extremidades ou laterais de hifas chamadas conidióforos. Enquanto os esporangiósporos dependem do rompimento do saco para a dispersão, os conídios costumam ser produzidos em longas cadeias ou agrupamentos, o que facilita sua liberação imediata por correntes de ar ou impacto mecânico assim que completam sua maturação (Figura 2B).

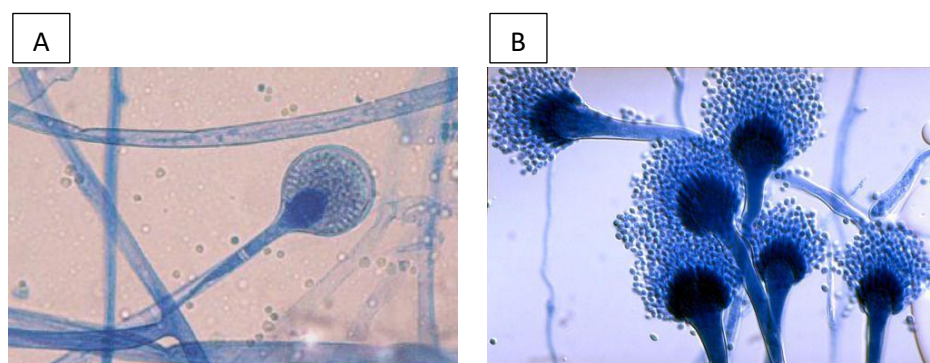


Figura 2 – Estruturas de reprodução sexuada fúngica. (A) Esporangióforo e os esporos esporangiósporos e (B) Conidióforo e os esporos conídios.

AULA PRÁTICA 7

ANÁLISE CELULAR DE FUNGOS UNICELULARES E MULTICELULARES

Objetivo da aula:

Avaliar a morfologia celular fúngica observando as características das leveduras e dos micélios, evidenciando os diferentes tipos de hifas e estruturas reprodutivas assexuadas.

Materiais:

- ✓ Fermento biológico;
- ✓ Água destilada estéril;
- ✓ Micélio fúngico (bolors);
- ✓ Corante azul de metileno;
- ✓ Microscópio;
- ✓ Alça de Inoculação;
- ✓ Bico de Bunsen;
- ✓ Lâminas e lamínulas;
- ✓ Papel absorvente.

Procedimentos

1- Fixação da amostra fúngica na lâmina

- ✓ Coloque uma gota de água sobre a lâmina para fixação da levedura e repita o mesmo processo em outra lâmina para fixação do micélio;
- ✓ Colete uma alçada do fermento biológico diluído em água (leveduras) e uma raspagem dos bolors (micélio) e faça movimentos de rotação sobre a água nas lâminas específicas para cada amostra para se obter um esfregaço de forma oval, bem fino e uniforme;
- ✓ Segurando a lâmina com a pinça, passa-a diversas vezes sobre o fogo do bico de Bunsen até a completa evaporação da água.

ATENÇÃO: não permaneça com a lâmina sobre a chama por há o risco de trincar e quebrar!

2- Coloração das células e visualização no microscópio

- ✓ Coloque algumas gotas do corante azul de metileno em todas as lâminas preparadas.
- ✓ Cubra o material com a lamínula e retire o excesso de corante com ajuda do papel absorvente.

- ✓ Posicione a lâmina adequadamente no microscópio e proceda as etapas de focagem.
- ✓ Avalie as características das células fúngicas unicelulares (levedura).
- ✓ Na lâmina de micélio, avalie os diferentes tipos de hifas e identifique as estruturas reprodutivas assexuadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

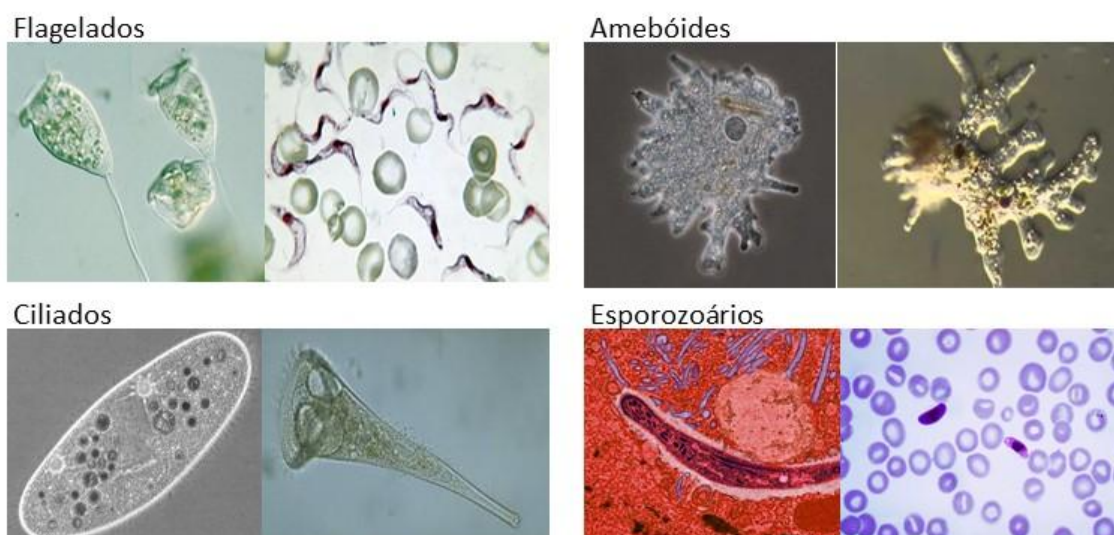
AULA 8

ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMOS (PARTE IV– PROTOZOÁRIOS)

PROTOZOÁRIOS

Os protozoários são organismos eucarióticos unicelulares, geralmente heterotróficos e desprovidos de parede celular rígida, habitando ambientes aquáticos, solos úmidos ou atuando como simbioses e parasitas de outros seres vivos.

Sua classificação clássica baseia-se primordialmente nos mecanismos de locomoção e captura de alimento, dividindo-os em quatro grupos principais: os sarcodíneos (ou rizópodes), que se deslocam por meio de expansões citoplasmáticas chamadas pseudópodes, como as amebas; os flagelados (ou mastigóforos), que utilizam um ou mais flagelos para propulsão; os ciliados, que possuem inúmeros cílios curtos e rítmicos, sendo este o grupo de maior complexidade estrutural; e os apicomplexos (ou esporozoários), que não possuem estruturas locomotoras evidentes e são caracterizados por um complexo apical utilizado para invadir células hospedeiras, sendo todos obrigatoriamente parasitas.



O termo "protozoário" é tradicionalmente usado para organismos heterotróficos, mas muitas algas unicelulares são estudadas junto com eles no grupo dos Protistas por compartilharem características como a organização celular simples e a motilidade. As chamadas "algas-protozoários" mais conhecidas são as Euglenas, que são fascinantes por serem mixotróficas: possuem cloroplastos para realizar fotossíntese como as plantas, mas também podem ingerir alimentos e se locomover por meio de um flagelo. Outro grupo de destaque é o das Dinoflageladas, que compõem o fitoplâncton marinho; embora sejam fotossintetizantes, algumas espécies podem se comportar como predadores ativos.

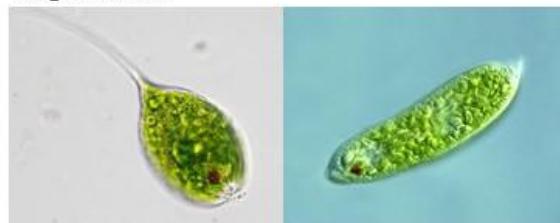
Somando-se a essa diversidade microscópica, encontramos grupos com estruturas esqueléticas e de captura altamente especializadas, como os Foraminíferos e os

Heliozoários. Os Foraminíferos são caracterizados por possuírem carapaças protetoras, geralmente de carbonato de cálcio, repletas de poros por onde projetam pseudópodes finos e ramificados para locomoção e alimentação. Já os Heliozoários, conhecidos popularmente como "animais-sol", possuem um corpo esférico de onde irradiam axópodes rígidos (um tipo de pseudópode) que lembram raios solares, utilizados para capturar e imobilizar presas.

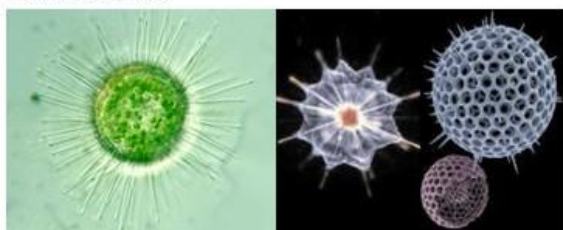
Foraminíferos



Euglenófitas



Heliozoários



Dinoflagelados



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.

AULA PRÁTICA 8

ANÁLISE MICROSCÓPICA DE PROTOZOÁRIOS

Objetivo da aula:

Avaliar a morfologia celular diferentes tipos de protozoários.

Materiais:

- ✓ Microscópio;
- ✓ Amostra de água doce (lago, rio);
- ✓ Pipeta Pasteur;
- ✓ Lâminas e lamínulas;
- ✓ Papel absorvente.

Procedimentos

- ✓ Pipetar uma gota da amostra de água na lâmina e cobrir com a lamínula.
- ✓ Ajuste a lâmina na mesa do microscópio.
- ✓ Observe a lâmina em diferentes aumentos.
- ✓ Faça um esquema (desenho) dos protozoários observados no espaço abaixo, indicando o aumento.

Aumento

Aumento

Aumento

Aumento

Aumento

Aumento

AULA 9

PROCESSOS METABÓLICOS CELULARES (RESPIRAÇÃO AERÓBIA, FERMENTAÇÃO E FOTOSSÍNTESE)

METABOLISMO CELULAR MICROBIANO

O metabolismo microbiano apresenta diferentes estratégias para a obtenção de energia, variando conforme a disponibilidade de oxigênio e luz.

Na respiração aeróbia, o microrganismo utiliza o oxigênio como aceptor final de elétrons em uma cadeia transportadora, processo que ocorre na membrana citoplasmática (em procariontes) e resulta na máxima eficiência energética, produzindo uma grande quantidade de ATP a partir da oxidação total da glicose em gás carbônico e água.

Equação geral do processo: $(C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + 38 \text{ ATP})$.

Quando o oxigênio está ausente, muitos microrganismos recorrem à fermentação, uma via anaeróbia menos eficiente que não utiliza uma cadeia de transporte de elétrons nem ciclo de Krebs; nela, o aceptor final é uma molécula orgânica interna (como o piruvato), resultando na produção de subprodutos como álcool etílico + gás carbônico ou ácido lático.

Equação geral da fermentação alcoólica: $(C_6H_{12}O_6 \rightarrow \text{etano} + CO_2 + 2 \text{ ATP})$

Equação geral da fermentação láctica: $(C_6H_{12}O_6 \rightarrow \text{ácido lático} + 2 \text{ ATP})$

Diferente desses processos catabólicos, a fotossíntese é uma via anabólica que converte a energia luminosa em energia química; nesse processo, pigmentos como a clorofila capturam fótons para gerar ATP e poder redutor (NADPH), que são então utilizados para fixar o gás carbônico em moléculas orgânicas complexas, sustentando a base das cadeias alimentares em ecossistemas aquáticos e terrestres.

Equação geral do processo: $(CO_2 + H_2O + \text{luz solar} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + O_2)$

AULA PRÁTICA 9

ANÁLISE DE DIFERENTES PROCESSOS METABÓLICOS

Objetivo da aula:

Avaliar a produção e consumo de diferentes metabólitos que são produzidos ou consumidos em reações metabólicas celulares.

Materiais:

Para teste de evidência da respiração aeróbia

- | | |
|----------------------|-------------------|
| ✓ Azul de bromotimol | ✓ Béquer; |
| Meio básico – Azul | ✓ Água destilada; |
| Meio neutro – Verde | ✓ Canudo. |
| Meio ácido – Amarelo | |

Para teste de evidência da fermentação alcoólica

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| ✓ Tubos de ensaio; | ✓ Fermento biológico; |
| ✓ Água destilada; | ✓ Balão de festas. |
| ✓ Açúcar; | |

Para teste de evidência da fotossíntese

- | | |
|--------------------------|---|
| ✓ Azul de bromotimol | ✓ Becker para 1 L; |
| Meio básico – Azul | ✓ Água destilada; |
| Meio neutro – Verde | ✓ 15 g de bicarbonato de sódio; |
| Meio ácido – Amarelo | ✓ Fonte de luz; |
| ✓ Tubo de ensaio grande; | ✓ Planta da espécie - <i>Elodea sp.</i> |

Procedimentos

1- Para teste de evidência indireta de respiração aeróbia

- ✓ Coloque em um béquer 150 ml de água juntamente com 1 ml (25 gotas) do indicador ácido-base (azul de bromotimol);

- ✓ Sopre a água com a ajuda de um canudo (para incorporação de gás carbônico na reação) até que a coloração altere.

2 - Para teste de evidência indireta de fermentação alcoólica

- ✓ Aqueça levemente a água destilada (aproximadamente 40°C).
- ✓ Separe 3 tubos de ensaio e prepare as seguintes reações:

Tubo 1: 4 mL de água, 1 g de açúcar e 1 g de fermento biológico.

Tubo 2: 4 mL de água e 1 g de fermento biológico.

Tubo 3: 4 mL de água e 1 g de açúcar.

- ✓ Cubra cada um dos tubos com um balão de festas.
- ✓ Observe a formação de gás carbônico através do aumento de volume do balão.

3 - Para teste de evidência indireta de fotossíntese

- ✓ Misturar os 15 g de bicarbonato em 1 L de água.
- ✓ Adicionar 1 ml (25 gotas) do indicador ácido-base (azul de bromotimol);

Obs: Neste momento o indicador ficará com a coloração amarela devido a formação de ácido carbônico.

- ✓ Colocar a *Elodea* dentro do tubo de ensaio.
- ✓ Acrescente a água contendo o bicarbonato dentro do tubo com a *Elodea*.
- ✓ Repita o mesmo procedimento para outro tubo de ensaio.
- ✓ Posicionar um dos tubos em um local com fonte constante de luz por 24 hs. O outro tubo posicioná-lo, pelo mesmo período, em local abrigado da luz (escuro).
- ✓ Verificar a cor da solução de água após o período.

Obs: Caso ocorra a fotossíntese, será consumida a fonte de carbono inorgânico da solução fazendo com que o meio deixe de ser ácido (amarelo), passando a ser neutro (verde) ou básico (azul).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R., BRUNS, D. E. **Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

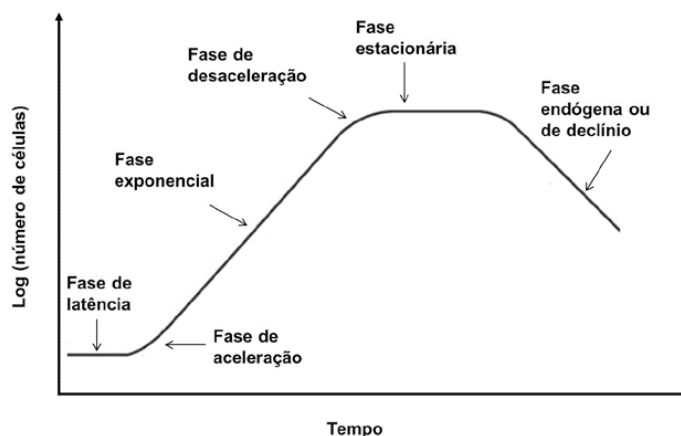
NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

AULAS 10, 11 E 12

ANÁLISE DE CRESCIMENTO MICROBIANO (CURVA DE CRESCIMENTO E MÉTODOS DIRETOS E INDIRETOS DE QUANTIFICAÇÃO)

CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano refere-se ao aumento do número de células em uma população, geralmente através da fissão binária, e segue um padrão gráfico característico dividido em quatro fases principais. Na Fase Lag (adaptação), os microrganismos estão se ajustando ao novo meio, ocorrendo intensa atividade metabólica e síntese de enzimas, mas sem aumento no número de células. A Fase Log (ou exponencial) é marcada pela divisão celular em ritmo máximo e constante, sendo o período de maior vitalidade da cultura. Quando os nutrientes tornam-se escassos e resíduos metabólicos tóxicos se acumulam, a população entra na Fase Estacionária, onde a taxa de crescimento se iguala à de mortalidade, mantendo o número de células viáveis constante. Finalmente, na Fase de Morte (ou declínio), as condições ambientais tornam-se insustentáveis, levando a uma redução exponencial da população.



Para construir o perfil completo da curva de crescimento de um microrganismo o procedimento padrão segue os seguintes passos: **Inoculação:** Adiciona-se uma pequena quantidade de microrganismo em meio de cultura líquido estéril. **Incubação:** O frasco é colocado em uma estufa ou agitador sob temperatura controlada. **Coletas Periódicas:** Em intervalos fixos, retira-se uma alíquota da amostra. **Medição:** Realiza-se a leitura da Densidade Óptica – DO - (espectrofotometria ou turbidimetria) e, se necessário, o plaqueamento para contagem de UFC. **Construção do Gráfico:** Os dados são plotados em um gráfico de Tempo (eixo X) versus o logaritmo do número de células ou DO (eixo Y).

ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO MICROBIANO

Para avaliar o perfil de crescimento de microrganismos em laboratório, utilizamos métodos que quantificam a variação da população ao longo do tempo (medição). Esses

métodos são divididos em diretos (contagem real de células ou colônias) e indiretos (estimativa baseada em propriedades físicas ou químicas da cultura).

Os métodos diretos permitem saber exatamente quantas unidades estão presentes na amostra. Para essa categoria de análise, destacam-se:

Contagem Padrão em Placas (UFC/mL): É o método mais confiável para contar células viáveis. Realiza-se uma diluição seriada da amostra original para que o número de colônias na placa seja contável (entre 25 e 250). O resultado é expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro ou grama.

Contagem Microscópica Direta: Utiliza-se uma lâmina especial chamada Câmara de Petroff-Hausser. Um volume conhecido de cultura é colocado na câmara e as células são contadas sob o microscópio. É rápido, mas não diferencia células vivas de mortas.

Os métodos indiretos permitem avaliar o crescimento microbiano analisando parâmetros indicativos de aumento de células e da população. Para essa categoria de análise, destacam-se:

Turbidimetria (Densidade Óptica - DO): Utiliza-se um turbidímetro ou espectrofotômetro, com uma faixa de comprimento de onda selecionada de 600 nm, para medir o quanto a luz é espalhada pelas células em suspensão. Quanto mais turvo o meio, maior a população. É o método padrão para monitorar a curva de crescimento em tempo real, embora também conte células mortas e detritos (por isso recomenda-se associar a esse processo algum dos métodos diretos).

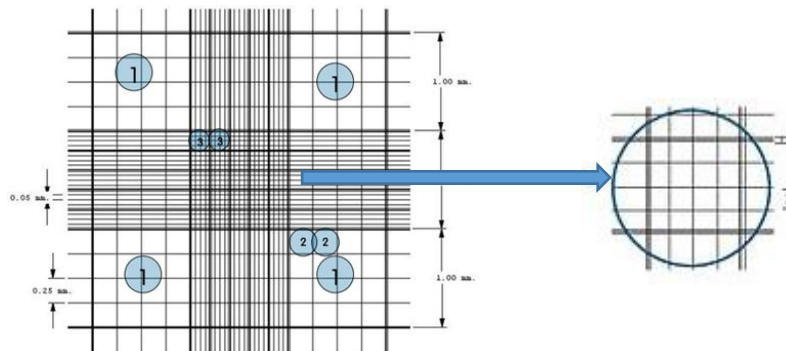
Atividade Metabólica: Mede-se o consumo de nutrientes ou a produção de resíduos, como forma indireta de crescimento. Quanto maior a produção do metabólito ou maior a redução de substrato de reação, maior a população de células.

ANÁLISE POR MICROSCOPIA DIRETA

A câmara de Neubauer é uma lâmina especial de microscopia, é mais espessa que as lâminas comuns e apresenta a delimitação de 9 quadrados de 1 mm^2 de área dispostos em quadrante. Ao se cobrir a câmara de Neubauer com a lamínula a área amostral em cada quadrado é de $0,1 \text{ mm}^3$.

Para a contagem de micro-organismos é considerado o quadrante central, devido ao tamanho das células. A subdivisão em 25 quadrados menores, que também se apresentam

divididos em 16 quadrículos, permite a alocação e visualização das células microbianas, e assim a contagem com maior precisão.



Após a contagem das células nos quadrantes, substitui-se os valores na seguinte equação:

$$C_{(\text{cel} / \text{mL})} = N \times 25 \times 10^4 \times D$$

Número dos quadrados médios da câmara

Fator de diluição da suspensão de levedura

Número médio de células nos 5 quadrados médio

Correção do volume de câmara (cm³ ou mL)

ANÁLISE POR TURBIDIMETRIA/ESPECTROFOTOMETRIA

O princípio da espectrofotometria ou turbidimetria é a análise da dispersão de energia radiante (luminosa) pela amostra analisada. O aumento na concentração de células suspensas na amostra aumenta a absorbância (diferença entre a intensidade da luz emitida e da luz incidente) de maneira equivalente devido à dispersão. Sendo assim, é possível associar a absorbância resultante da opacidade da amostra com a concentração de micro-organismos em suspensão.

A análise e padronização do inóculo, quando se utiliza o método de quantificação em espectrofotômetro, é realizada através de uma curva padrão. Para formação da curva, dilui-se a amostra em estudo de forma seriada, avalia-se as absorbâncias obtidas em cada diluição e gera-se então a curva padrão que irá relacionar a absorbância com a quantidade de célula na amostra.

ANÁLISE POR CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

A quantificação por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) baseia-se no princípio biológico de que cada célula microbiana viável, quando isolada em um meio de cultura

sólido adequado, irá se multiplicar exaustivamente até originar uma colônia visível a olho nu. Como uma única colônia pode, teoricamente, surgir de uma única célula ou de um pequeno agrupamento de células (como cadeias ou cachos), utiliza-se o termo "UFC" em vez de apenas "número de células".

Para que a contagem seja possível e estatisticamente válida, o processo segue etapas rigorosas:

Diluição Seriada: Como as amostras originais geralmente possuem milhões de microrganismos por mililitro, é impossível contá-los diretamente na placa, pois as colônias cresceriam sobrepostas. Por isso, realiza-se uma diluição.

Inoculação (Plaqueamento): O material diluído é transferido para placas de Petri contendo ágar nutritivo por semeadura em superfície ou por profundidade

Incubação e Contagem: Após o crescimento, selecionam-se as placas que apresentam entre 25 e 250 colônias. Placas com mais de 250 colônias são consideradas "Incontáveis" e com menos de 25 são estatisticamente irrelevantes.

Cálculo Final: Para descobrir a concentração da amostra original, utiliza-se a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nº de Colônias}}{\text{Volume Inoculado (mL) X Fator de Diluição}}$$

AULA PRÁTICA 10

ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICROBIANO – CURVA PADRÃO DE CRESCIMENTO

Objetivo da aula:

Avaliar o comportamento de crescimento dos microrganismos, gerando sua curva de crescimento.

Materiais:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| ✓ Caldo TSB; | ✓ Pipeta e ponteira; |
| ✓ Inóculo padronizado; | ✓ Estufa de cultivo. |

Procedimentos

- ✓ Em 13 tubos de ensaios estéreis, adicionar 5 mL do meio de cultura (caldo TSB).
- ✓ Inocular a quantidade de células padronizadas (10^8 UFC/mL).
- ✓ Identificar cada um dos tubos, evidenciando o tempo em que cada um deles irá representar.
- ✓ Colocar os 13 tubos no interior da estufa de crescimento.
- ✓ A cada 1 hs de cultivo retirar um tubo da estufa e guardá-lo para as análises de quantificação por espectrofotometria.
- ✓ Repetir o procedimento até o tubo referente a 12 hs de cultivo. O último tubo, a partir deste ponto, só será retirado após 24 hs de cultivo.
- ✓ Proceder a quantificação das culturas por análise de espectrofotometria.

AULA PRÁTICA 11

QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA E UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS

Objetivo da aula:

Avaliar o crescimento microbiano através da quantificação por espectrofotometria e unidades formadoras de colônias.

Materiais:

Para quantificação indireta por espectrofotometria

- ✓ Culturas obtidas nos diferentes tempos de crescimento (aula anterior);
- ✓ Caldo TSB;
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água peptonada;
- ✓ Tubos de ensaio;
- ✓ Pipeta e ponteira;
- ✓ Cubetas de leitura;
- ✓ Espectrofotômetro.

Para quantificação direta por contagem de número de colônias

- ✓ Culturas obtidas nos diferentes tempos de crescimento (aula anterior);
- ✓ Ágar contagem;
- ✓ Pipeta e ponteira;
- ✓ Placas de Petri;
- ✓ Alça de Drigalski;
- ✓ Estufa de cultura.

Procedimentos

1- Quantificação por espectrofotometria

a) Construção da curva de crescimento

- ✓ Calibrar o espectrofotômetro adicionando água destilada na cubeta e fazendo a calibração a 600 nm.
- ✓ Zerar o equipamento adicionando na cubeta apenas o caldo TSB e fazendo a leitura a 600 nm.
- ✓ Adicionar na cubeta a cultura referente ao crescimento de 1 hs e fazer a leitura a 600 nm.

- ✓ Com os valores de absorbância obtido construir a curva de crescimento através da construção de um gráfico com a relação tempo x absorbância.
- ✓ Identificar os tempos que representam os pontos de fase lag, log, estacionária e declínio.

b) Quantificação por espectrofotômetro

- ✓ Escolher uma das culturas que se encontrem na faixa de crescimento log.
- ✓ Promover a diluição seriada (5 diluições) da cultura.

Obs: Para cada tubo de diluição adicionar 9 mL de água peptonada e 1 mL da diluição anterior.

- ✓ Promover a leitura das 5 diluições no espectrofotômetro e obter suas respectivas absorbâncias.
- ✓ Calcular a quantidade de células pela relação g/mL utilizando a equação da curva padrão previamente estabelecida.

2- Quantificação por unidades formadoras de colônia

- ✓ Adicionar o meio de cultura em pelo menos 3 placas de petri e aguardar completa solidificação.
- ✓ Adicionar 0,1 mL das 3 últimas diluições seriadas realizadas anteriormente e promover a inoculação por espalhamento em superfície.
- ✓ Colocar as placas na estufa de crescimento à 30°C por 24 hs.
- ✓ Após o crescimento, promover a contagem das colônias geradas nas placas e calcular o número de UFC/mL.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nº de Colônias}}{\text{Volume Inoculado (mL) X Fator de Diluição}}$$

AULA PRÁTICA 12

QUANTIFICAÇÃO POR MICROSCOPIA

Objetivo da aula:

Avaliar o crescimento microbiano através da quantificação pela contagem no número de células em câmara de Neubauer.

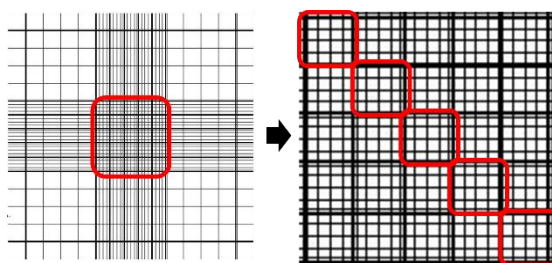
Materiais:

Para quantificação direta por microscopia

- | | |
|--|----------------------|
| ✓ Câmara de Neubauer; | ✓ Lamínula; |
| ✓ Azul de metileno; | ✓ Pipeta e ponteira; |
| ✓ Fermento biológico solubilizado em água; | ✓ Microscópio. |

Procedimentos:

- ✓ Adicionar 1 g de fermento biológico em 100 mL de água destilada e promover a completa diluição da mistura.
- ✓ Utilizar 0,1 mL da levedura solubilizada e acrescentar 0,9 mL de solução de azul de metileno. Homogeneizar completamente.
- ✓ Transfira uma gota para a câmara de Neubauer, recubra com a lamínula.
- ✓ Leve ao microscópio e faça a contagem com a objetiva de 40x considerando o quadrante central.
- ✓ Conte os 5 quadrantes na diagonal.



- ✓ Anote o número de células viáveis (não coradas) e o número de células viáveis (coradas com o azul de metileno). Anote também a quantidade de células apresentando brotamento.

Obs: Uma boa contagem deve estar entre 150 e 250 no total dos quadrados médios.

- ✓ Após realização da contagem, calcule a quantidade de células/mL, seguindo o cálculo abaixo. Faça o cálculo para as células viáveis, inviáveis e em brotamento.

$$C_{(\text{cel} / \text{mL})} = N \times 25 \times 10^4 \times D$$

Número dos quadrados médios da câmara

Fator de diluição da suspensão de levedura

Número médio de células nos 5 quadrados médio

Correção do volume de câmara (cm³ ou mL)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTRIDGE, B. H., REYNOLDS, A. P. **Técnicas básicas de laboratório clínico**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M., BUCCI, A. R. **Microbiologia prática**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2024.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A.F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2 ed. 2019.