Microbiologia – aula práticas

Primeira parte (Caracterização de microrganismos)

- **Preparo e observação de lâminas**
- **Microscopia de luz**
- **Morfologia de bactérias e fungos**
  - 1ª. Prova Prática – 25, 26 e 27 de abril de 2018

Segunda parte (Microbiologia aplicada)

- **Postulado de Koch**
- **Esterilização e meio de cultivo**
- **Controle de microrganismos; efeito do ambiente**
- **Análise e tratamento de água**
  - 2ª. Prova Prática – 27, 28 e 29 de Junho 2017

Postulado de Koch (1881)

sequência de procedimentos utilizada para se estabelecer a relação causal entre um microrganismo e uma doença

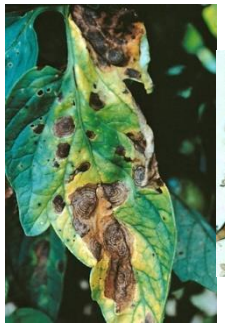
1) o microrganismo deve estar associado com a doença em todas as plantas sintomáticas (associação constante patógeno-hospedeiro)

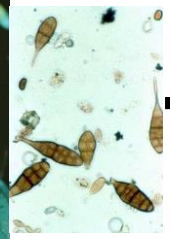
2) o microrganismo deve ser isolado da planta doente e cultivado em cultura pura (isolamento/cultivo)

3) o microrganismo em cultura pura deve ser inoculado sobre plantas sadias (mesma espécie ou variedade) e produzir a mesma doença observada nas plantas no campo (inoculação do organismo em plantas sadias)

4) o microrganismo deve ser isolado em cultura pura novamente e suas características devem ser as mesmas das observadas em (2) (reisolamento do patógeno)

POSTULADO DE KOCH EM FITOPATOLOGIA



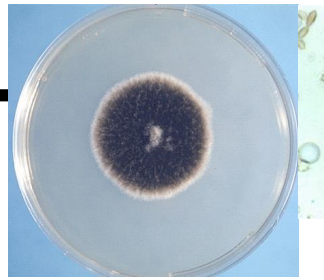


Desinfestação superficial

Transferência para o meio de cultura

Microrganismo presente em plantas sintomáticas (**Associação constante**[1])

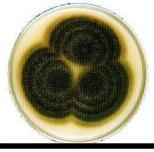
Isolamento[2] do microrganismo



Inoculação[3] de planta sadia

Reprodução dos sintomas

Reisolamento[4] do microrganismo



parasita não obrigatório (necrotrófico)

organismos que possuem fases como parasitas, mas que também podem viver na ausência do hospedeiro

(maioria dos **fungos** e **bactérias**)

podem ser isolados facilmente

parasita obrigatório (biotrófico)

organismos que dependem de seu hospedeiro vivo durante seu ciclo de vida

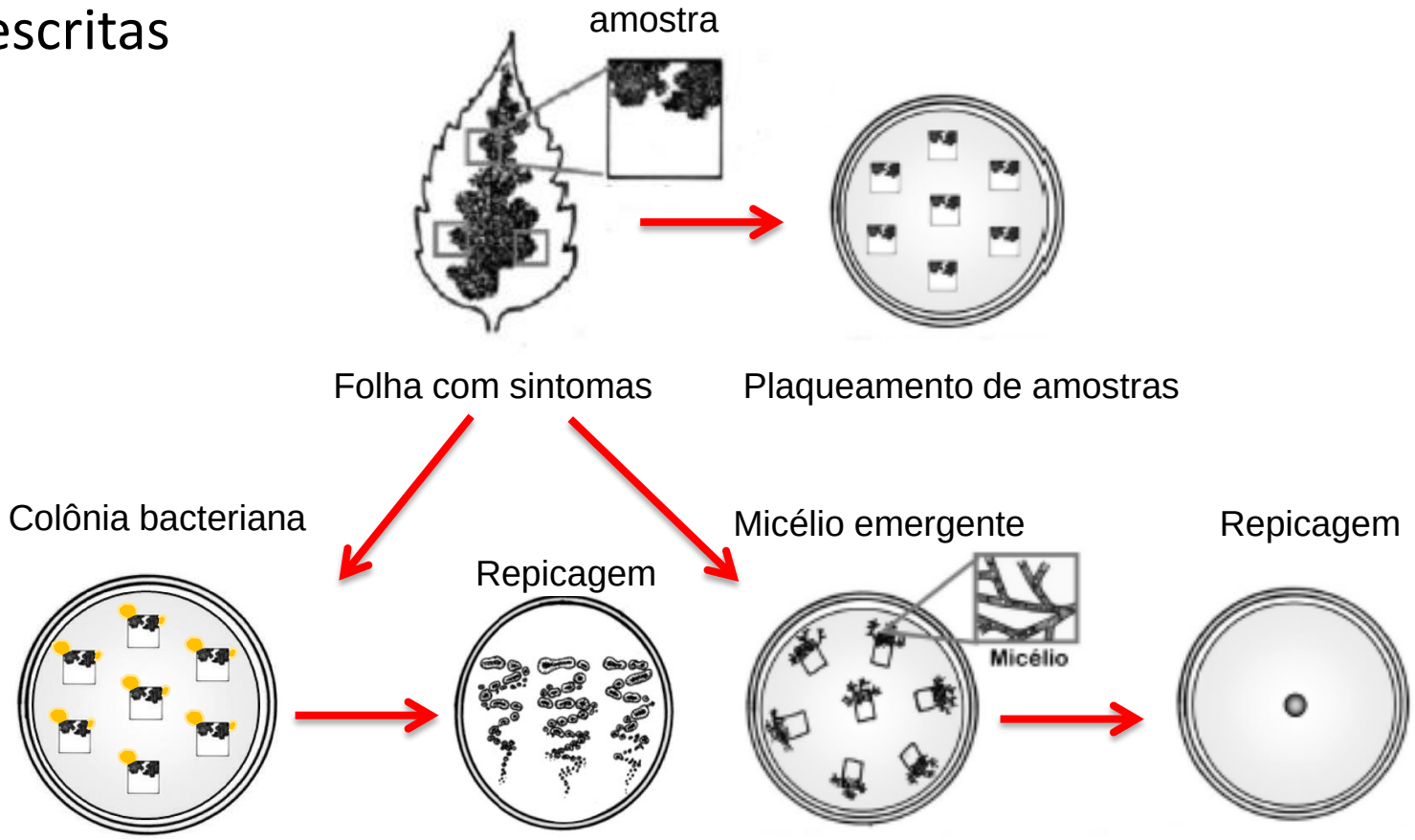
(**vírus**, fungos causadores de **ferrugens**, **míldio** e, **oídios**)

não podem ser isolados

devem ser transferidos da planta doente para uma sadia

Isolamento e cultivo do patógeno

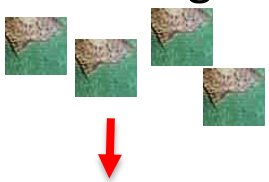
O microrganismo (patógeno) deve ser isolado da planta doente, cultivado em cultura pura e suas características descritas



Isolamento de patógeno fúngico foliar

retirar 4-5 frações da região de transição (3 a 5 mm)

mancha de *Cercospora* (beterraba)

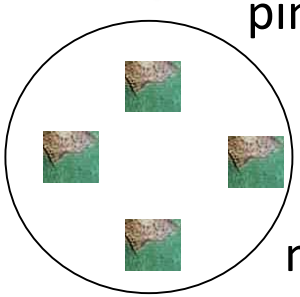


lavar c/ álcool 70% (30 a 60 s)

hipoclorito de sódio (0,5-1%)/1 min.

lavar em água esterilizada

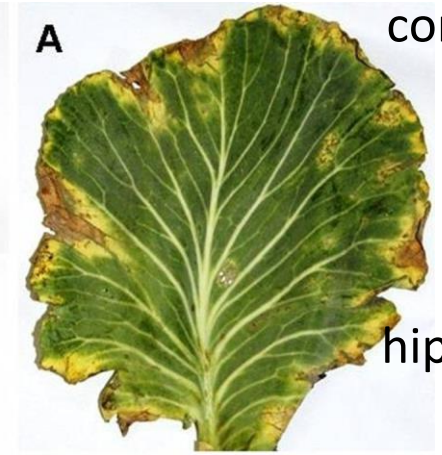
pinça



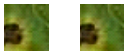
meio de cultura

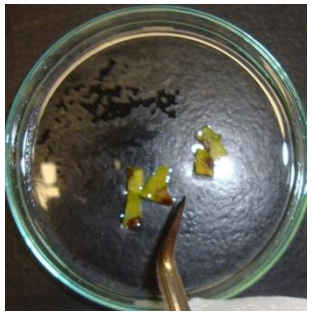
realizar o isolamento próximo a lamparina

Isolamento de patógeno bacteriano foliar



cortar 1-2 pedaços da região de transição (3 a 5 mm)



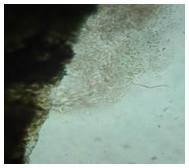


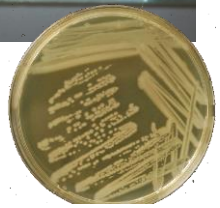
lavar c/ álcool 70% (30 a 60 s)

hipoclorito de sódio (0,5-1%)/1 min.

lavar em água esterilizada

picar os fragmentos em lâmina de vidro com água esterilizada (esperar 1-2 min.)



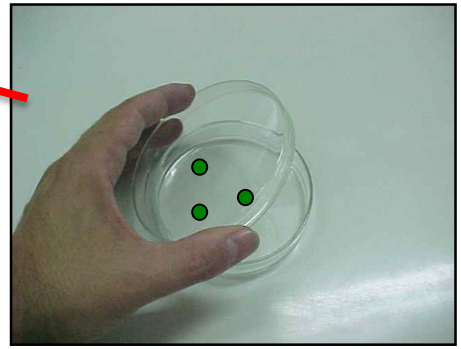


transferir a suspensão para meio NA fazendo riscas com alça

Isolamento direto do patógeno
(esporos + micélio presentes)

micélio, conidióforo
e conídios

placa de Petri
com BDA



realizar o isolamento próximo à lamparina

POSTULADO DE KOCH – 1881

1 – Associação constante patógeno-hospedeiro

2 – Isolamento / cultivo

3 – Inoculação do organismo em plantas sadias

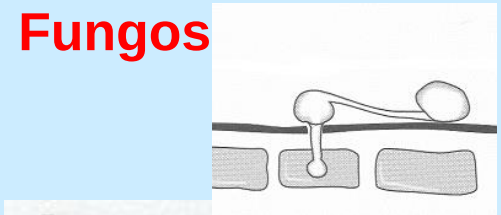
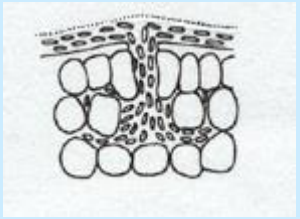
O microrganismo em cultura pura deve ser inoculado sobre plantas sadias (mesma espécie ou variedade na qual a doença apareceu) e reproduzir a doença

Considerar o período de incubação de cada doença

Colocar um patógeno em contato com - ou no interior de - tecido de planta hospedeira e fornecer condições para seu desenvolvimento

4 – Reisolamento

VIAS DE PENETRAÇÃO DE PATÓGENOS

Fungos 	a - Direta – através da cutícula b - Aberturas naturais - estômatos, - lenticelas, - hidatódios c - Ferimentos
Bactérias 	a - Ferimentos b - Aberturas naturais
Vírus	a - Ferimentos b - Vetores (insetos, nematoides, etc.)

Exercício prático: Inoculação de vírus em abobrinha

folhas de abobrinha c/ vírus

macerar o tecido foliar em tampão

polvilhar carborundo nas folhas das plantas sadias de abobrinha

molhar algodão ou o indicador na suspensão e passar sobre a folhas **(inoculação por microferimentos)**

lavar a folha com água

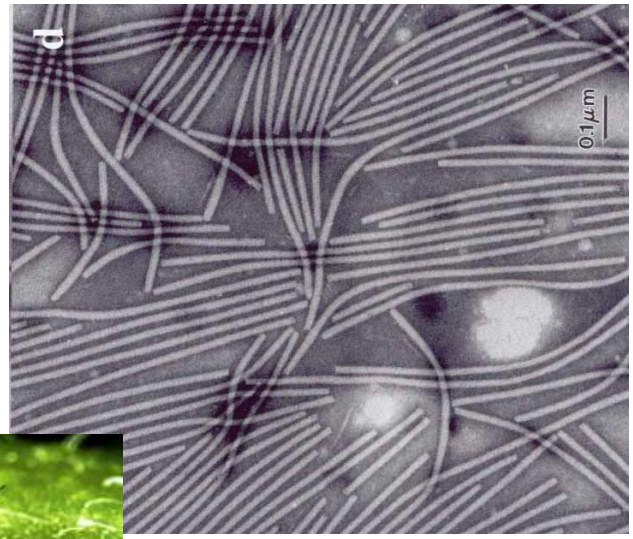
colocar a planta em condições adequadas

Vírus do mosaico amarelo da abobrinha
(*Zucchini yellow mosaic virus - ZYMV*)

hospedeiros e vetor

ZYMV: Potyvirus

RNA fs, senso positivo



hospedeiros: principalmente **cucurbitáceas**

vetor: afídeos (pulgões)

relação não persistente

Sintomas do vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus*)

abobrinha de moita

melancia

kabotia