

BMM 290 – Microbiologia Básica para Biologia 2018

PROCOLOS DE AULA PRÁTICA

INSTRUÇÕES PARA USO DE UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1-BANCADA SEMPRE DESINFETADA IMEDIATAMENTE ANTES DO INÍCIO DO TRABALHO E AO ENCERRÁ-LO.

2- A TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL COM ALÇA DE PLATINA DEVE SER FEITA COM ESTA DEVIDAMENTE ESTERILIZADA: COLOCADA EM CHAMA ATÉ FICAR INCANDESCENTE E ESFRIADA AO AR POR ALGUNS SEGUNDOS.

3-A MANIPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS DEVE SER REALIZADA SEMPRE PRÓXIMA AO BICO DE BUNSEN.

4-TODO O MATERIAL INOCULADO COM MICRORGANISMOS, DEVERÁ SER IDENTIFICADO COM O NOME DO GRUPO, PARA SER VERIFICADO POSTERIORMENTE.

AULA PRÁTICA 1 – 13/09 (Integral) e 17/09 (Noturno) **Morfologia bacteriana e Diversidade bacteriana**

1ª parte:

OBJETIVO : Observar as diferentes formas de bactérias em materiais de diversas procedências naturais.

Preparação de lâminas:

a) *esfregação de boca* – com o auxílio de um “cotonete”, esfregar a região dos dentes, da bochecha e das gengivas, e esfregar o cotonete na lâmina em uma gota d’água.

b) *soro do iogurte* – com auxílio de uma alça de platina, colocar numa lâmina uma amostra do soro do iogurte. Espalhar o esfregação, fixar e corar como indicado abaixo.

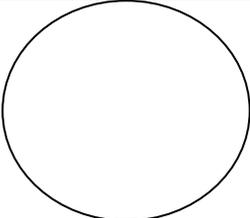
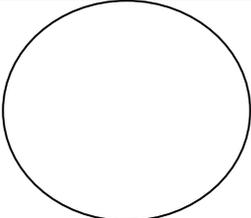
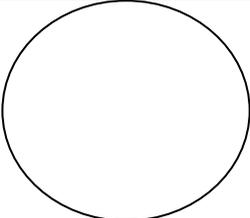
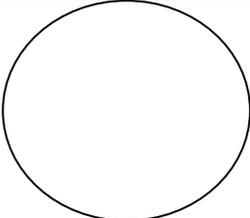
c) *suspensão de solo*- Com o auxílio de uma alça de platina, preparar o esfregação em lâmina de uma gota do material. Espalhar o esfregação, fixar e corar como indicado abaixo.

d) *cianobactérias de água de manancial* – observar o material a fresco. Com auxílio de uma alça de platina, colocar numa lâmina uma amostra da água. Espalhar o esfregação e cobrir com lamínula.

Fixação e coloração das lâminas preparadas com os materiais descritos nos itens a), b) e c) como segue.

Depois de seco o esfregação, segurar a lâmina com o pregador e passa-la 3 vezes dentro da chama do bico de Bunsen. Esperar esfriar, levar ao suporte da pia e cobrir o esfregação com uma gota do corante cristal violeta. Deixar por 1 minuto. Esgotar a lâmina. Lavar com um fio de água corrente, esgotar a água e secar com papel, sem esfregar. Colocar uma gota de óleo de imersão e observar ao microscópio sob o maior aumento.

Visualizar, ao microscópio, as células das diferentes preparações. Desenhar cada uma abaixo

			
Boca Forma:	Iogurte Forma:	Solo Forma:	Água de manancial Forma:
Arranjo das células:	Arranjo das células:	Arranjo das células:	Arranjo das células:

2ª parte:

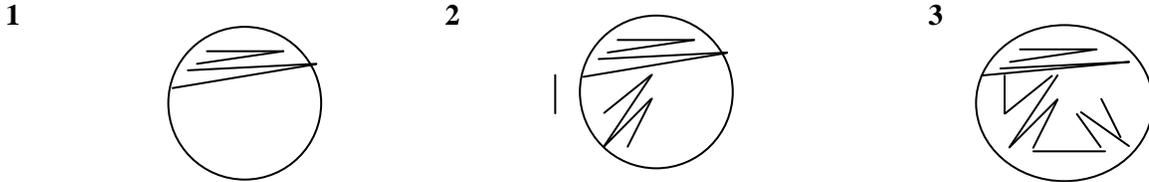
OBJETIVO: Aprender técnicas de semeadura

Utilizando a suspensão de solo, inocular, no meio sólido, o volume contido em uma alça de platina, aplicando técnicas de assepsia.

Exercício: Procedimentos de semeadura-Espalhar levemente na superfície de uma placa, a película contida na alça, conforme o desenho abaixo.

Técnica de semeadura para isolamento de colônias

Atenção: Flambar e esfriar a alça de platina antes e depois de cada etapa do espalhamento.



As placas serão incubadas a 30°C por 24-48 horas, e depois guardadas a 4°C até a próxima aula.

AULA PRÁTICA 2 – 20/09 (Integral) e 24/09 (Noturno)

Estruturas bacterianas

1ª parte –

Verificação de características de colônias bacterianas, conceito de isolamento

OBJETIVO - exame das placas semeadas na aula anterior

Definição de colônia:

Procedimento:

1. Examinar o aparecimento, ou não, de crescimento nos meios de cultura semeados, observando colônias isoladas nas placas de meio sólido.
2. Observar o **aspecto macroscópico** das colônias quanto a: forma (bordas arredondadas, bordas irregulares), cor (branca, amarela, etc.), tamanho (relativo às outras colônias) e brilho (brilhante, translúcida ou opaca) .

2ª parte-

OBJETIVO: Aprender a técnica de coloração de Gram

Material- lâminas de vidro, soluções de violeta de genciana, lugol e fucsina. Álcool. Alça de platina

Procedimento-escolher, nas placas, duas colônias de aspectos distintos. Corar pelo método de Gram, como segue.

1. Preparação do esfregaço. Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água de torneira. Com a alça de platina tocar levemente na superfície da colônia e emulsionar o material na gota de água (caso o microrganismo seja fornecido em suspensão, apenas colocar uma gota desta sobre a lâmina). Deixar secar.

2. Fixação pelo calor. Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.

3. Coloração de Gram.

Cobrir o esfregaço seco e fixado com violeta genciana e deixar por 1 minuto. Esgotar a lâmina.

Cobrir com solução de lugol. Deixar 1 minuto. Esgotar a lâmina.

Mantendo a lâmina inclinada, pingar gotas de álcool até que não se desprenda mais corante da preparação.

Lavar com água corrente.

Cobrir a lâmina com solução de fucsina e deixar por 1 minuto. Lavar a lâmina com água e secar com papel, sem esfregar.

Examinar ao microscópio com a objetiva de imersão.

OBS-Observar as lâminas de referência, indicadas pelo professor.

Questões:

- 1) Que cores apresentaram as bactérias de cada colônia após a coloração de Gram? Como elas são classificadas em relação a esta coloração?

3ª parte

OBJETIVO: Verificar diferença na resistência à fervura entre dois tipos de bactérias

Material Biológico: No exercício serão usadas duas bactérias diferentes: A e B. Cada grupo fará o exercício usando uma única bactéria.

Esfregaço- preparar uma lâmina contendo um esfregaço da bactéria de seu estudo, a partir do tubo do inóculo. Fazer a coloração de Gram de cada lâmina e entregar ao monitor.

Procedimento: Inoculação dos tubos: 2 tubos contendo meio de cultura estéril serão inoculados, cada um, com uma alçada de cultura A: tubos A1 e A2 ou da cultura B, tubos B1 e B2.

Tratamento por calor: colocar em água fervente, os tubos recém inoculados, A2 ou B2. Após 5 minutos, os tubos voltarão à temperatura ambiente. Os tubos A1 e B1 serão os controles dos experimentos.

Todos os tubos deverão ser deixados em estantes, nas bancadas. Os tubos serão incubados a 37°C por 24 horas, e depois guardados a 4°C até a próxima aula.

AULA PRÁTICA 3 – 27.09 (Integral) e 01/10 (Noturno) **Estruturas bacterianas**

1ª parte

OBJETIVO: Observar a cápsula bacteriana e a produção de exopolissacarídeo

Procedimento: observar ao microscópio as lâminas coradas para evidenciar a cápsula bacteriana.

Questão: Quais são as funções desta estrutura?

2ª parte

OBJETIVO: Verificar diferença na resistência à fervura entre dois tipos de bactérias.

Procedimento: Leitura dos resultados da terceira parte da aula prática 2: Observar os crescimentos das culturas inoculadas na aula anterior, através da turbidez dos meios. Observar as lâminas das bactérias A e B.

Questão: Com base na observação das lâminas, como explicar os resultados dos tratamentos?

OBS. A aula prática 4 inicia-se hoje com a inoculação dos meios de cultura.

AULA PRÁTICA 4 – Nutrição

04.10 (Integral) e 08.10 (Noturno) – análise dos resultados

OBJETIVOS:- Inoculação de várias espécies bacterianas em diferentes meios de cultura. Conceito de meio de cultura. Conceitos de meios seletivos e meios diferenciais. Conceito de fator de crescimento.

Meios de cultura complexos**Ágar Nutriente (em g/l)**

Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar	15

Ágar Manitol Salgado (em g/l)

Extrato de Carne	1,0
Peptona	10,0
NaCl	75,0
Manitol	10,0
Vermelho fenol	0,025
Ágar	15,0

Ágar Sangue (em g/l)

Triptona	15,0
Peptona de soja	5,0
NaCl	5,0
Ágar	5,0
Sangue desfibrinado de carneiro	5,0

Ágar McConkey (em g/l)

Peptona	17,0
Proteose-peptona	3,0
Lactose	10,0
Sais biliares	1,5
NaCl	5,0
Ágar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

Ágar cetrimide (em g/l)

Digerido pancreático de gelatina	20,0
Cloreto de Magnésio	1,4
Sulfato de potássio	10,0
Cetrimide (brometo de tetradeciltrimetil amônio)	0,3
Ágar	13,6

Todos os meios são esterilizados por autoclavagem a 121^o C por 15 minutos ou filtrados.

***Peptona**- produto da digestão de proteínas, composto de aminoácidos.

****Extrato de carne**- extrato aquoso de tecido muscular, concentrado, composto por vitaminas, sais, carboidratos e outras substâncias hidrossolúveis .

*** **Extrato de levedura**- extrato aquoso de leveduras, concentrado, rico em vitaminas do complexo B, além de outros compostos orgânicos, ricos em nitrogênio.

Material Biológico:

Culturas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus epidermidis*.

Procedimento:

Inocular *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus epidermidis* nos meios indicados na tabela.

Meios	Bactérias		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>S. epidermidis</i>
Ágar Manitol salgado			
Ágar Mc Conkey			
Ágar nutriente			
Ágar cetrimide			

Leitura:

Marque na tabela o resultado dos crescimentos das bactérias nos meios, descrevendo as características das colônias.

- 1) Qual dos meios utilizados é diferencial? Qual dos meios utilizados é seletivo?
- 2) Observar os halos de hemólise em placas de agar sangue (demonstração).