

BMM 0122 - Microbiologia Básica

Engenharia Ambiental - 2019

Prática 1: Isolamento de Micro-organismos de amostras de solo e água

1. Introdução:

As bactérias, assim como outros micro-organismos apresentam importante atividade no ambiente aquático (mar, rio, nascentes, etc.), no solo ou em superfícies (paredes, monumentos, piso e etc.), sobrevivendo na forma livre ou de biofilmes, apresentando uma posição chave na cadeia alimentar, reciclando os elementos do meio através de sua participação nos ciclos bioquímicos. Entretanto, alguns organismos encontrados nestes ambientes, podem também apresentar associações (benéficas ou deletérias) com outros organismos (animais e plantas). Tais organismos são de suma importância uma vez que, podendo afetar a sanidade dos organismos aos quais estão associados ou ainda apresentando características de interesse biotecnológico, tais como síntese de novas moléculas (antibióticos, imunossupressores, anticâncer e etc.) ou novos processos (produção de etanol, biodiesel, promoção de crescimento vegetal e etc.).

Sendo assim, o conhecimento desta diversidade microbiana presente em diferentes ambientes pode permitir a detecção de potenciais patógenos presentes no ambiente (água, solo e superfícies), bem como isolar micro-organismos com potencial aplicação biotecnológica, os quais após o seu isolamento devem ser identificados, caracterizados e depositados em uma coleção de culturas para posterior projetos de bioprospecção.

2. Procedimentos:

2.1. Formação dos grupos de trabalho

- a) A turma deverá formar 6 a 8 grupos de 2 a 5 alunos;
- b) Os grupos serão mantidos até o final do curso;
- c) As notas de atividades serão do grupo.

2.2. Isolamento de micro-organismos (fungos e bactérias)

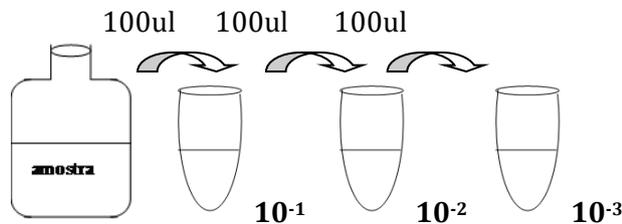
2.2.1. Amostras de solo

- a) Pesar 1 grama de solo;
- b) Transferir para um tubo* contendo 9 mL de solução fisiológica (suspensão original - amostra),
- c) Misturar bem a suspensão e preparar diluições até 10^{-3} (cada diluição é determinada pela adição de 0,1mL da suspensão de solo em 0,9mL de solução fisiológica),
- d) Homogeneizar bem os tubos das diluição 10^{-2} e 10^{-3} e semear 100 μ L em placas Petri* contendo Meio de cultura TSA (10%) contendo fungicida ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 100 μ L em placas contendo Meio de cultura BDA (10%) contendo antibiótico ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$),
- e) Espalhar, com alça de Drigalski, a suspensão de solo,
- f) Manter as placas contendo as suspensões a 28°C por 24 - 120 horas,

- g) Observar o número e a diversidade de colônias (**Prática 2**),
- h) Determinar o número de colônias por placa e estimar a quantidade de Unidade Formadora de Colônias por grama de solo ($\text{UFC} \cdot \text{g de solo}^{-1}$) (**Prática 2**),

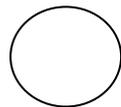
2.2.2. Amostras de água

- a) Serão utilizados 5 mL de água do córrego Pirajussara,
- b) Fazer diluições seriadas* até 10^{-2} , utilizando solução fisiológica (Figura 01),
 1. Homogeneizar os tubos das diluição 10^{-1} e 10^{-2} e semear 100 μL em placas de Petri* contendo Meio de cultura TSA (10%) contendo fungicida ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 100 μL em placas contendo Meio de cultura BDA (10%) contendo antibiótico ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),
- c) Espalhar, com alça de Drigalski (semeadura por espalhamento), as diluições das amostras de água,
- d) Manter as placas contendo as suspensões a 28°C por 24 – 120 horas,
- e) Observar o número e a diversidade de colônias (**Prática 2**),
- f) Determinar o número de colônias por placa e estimar a quantidade de Unidade formadora de Colônias por mililitro de água ($\text{UFC} \cdot \text{mL de água}^{-1}$) (**Prática 2**).

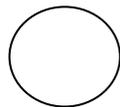


(A) preparar diluições seriadas (decimais)

100ul amostra ou 100uL de uma das diluições



ou



(B) semeadura por espalhamento

Figura 01. Procedimento para obtenção de diluições seriadas e isolamento de micro-organismos de amostras diversas.

* As placas de Petri e os tubos deverão ser abertos sempre próximos ao bico de Bunsen para evitar contaminação com micro-organismos do ar e perdigotos. Após semeadura, manter as placas com a tampa voltada para baixo.

3. Questões para a próxima aula.

As questões valem 1,0 cada, a ser entregue por grupo e devem ser entregues antes da próxima aula prática.

- a) Qual a importância da utilização do fungicida e/ou do antibiótico no meio de cultura e porque devemos realizar as diluições seriadas?
- b) Como determinar a quantidade de unidades formadora de colônias por grama de solo ($\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) ou mililitro de água ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$)?
- c) Porque determinamos o número de UFC e não de células microbianas por amostra? Explique.

Prática 2: Contagem e purificação de Micro-organismos de amostras de solo e água

1. Procedimentos:

1.1. Contagem de micro-organismos

- Com a tampa voltada para baixo, contar o número de colônias em cada placa, considerando o tipo de amostra (água ou solo) e diluições.
- Determinar número de UFC por grama ou mililitro de amostra.

1.1. Purificação de micro-organismos

- Selecionar 6 colônias isoladas, sendo 4 de bactérias e 2 de fungos,
- Com uma alça de anel ou palito, coletar cada bactéria em separado,
- A cada isolamento a alça deverá ser flambada ou o palito trocado,
- Proceder a purificação por estrias de esgotamento (Figura 2), para isso:
 - Coletar a colônia e estriar em uma extremidade da placa de Petri;
 - Flambar a alça e puxar um risco da área previamente estriada,
 - Repetir este procedimento 3 vezes de acordo com a figura 2.
- Manter as placas contendo as suspensões a 28°C por 24 – 120 horas,

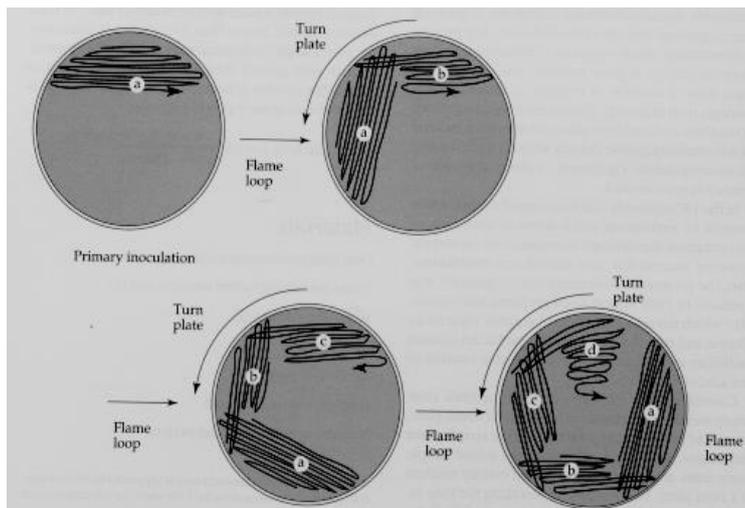


Figura 02. Purificação de micro-organismos pela técnica de estrias de esgotamento.

2. Questões para a próxima aula.

As questões valem 1,0 cada, a ser entregue por grupo e devem ser entregues antes da próxima aula prática.

- No que difere bactérias Gram positiva e Gram-negativa? Explique.
- Porque deve ser aplicada a Fucsina ou safranina ao final da coloração de Gram?

Prática 3: Preparação de estoque e coloração de Gram

1. Introdução

A técnica de coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista holandês Hans Cristian Gram. É a coloração mais usada rotineiramente no laboratório de Microbiologia. Ela divide as bactérias em dois grandes grupos: **Gram positivas** e **Gram negativas**, além de permitir o estudo da célula bacteriana quanto à sua morfologia (cocos ou bacilos) e arranjos. As bactérias capazes de reter o complexo formado pelo cristal violeta (CV) mais iodo (complexo iodo pararosanilina) coram-se em **violeta (Gram +)**, enquanto os que não retêm o complexo coram-se em **vermelho (Gram -)**.

A coloração de Gram não está relacionada com os constituintes químicos da parede celular, mas sim com sua estrutura física, o que confere a característica de positividade ao Gram. Esta coloração é o ponto de partida na identificação bacteriana, mas não deve nunca ser utilizada como identificação definitiva. É importante ressaltar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil, quando corretamente realizada e interpretada. Técnicas baseadas em diferenças na utilização de diferentes fontes de carboidratos e nitrogênio, bem como técnicas de biologia molecular são importantes para a correta identificação de uma espécie.

2. Procedimentos

2.1. Preparo de estoque em tubos

- Selecionar as colônias isoladas nas placas de estrias de esgotamento e marcar as colônias com caneta para superfície de vidro (as marcações deverão ser feitas no fundo da placa de Petri),
- Flambar a boca dos tubos após a retirada do tampão de algodão. Este deverá ser mantido pelo dedo mínimo da mão que está segurando a alça,
- Abrir a placa de Petri próxima à chama do bico de Bunsen,
- Coletar a colônia previamente marcada com a alça/palito, estriar na superfície do meio de cultura inclinado, presente no interior do tubo (figura 3).

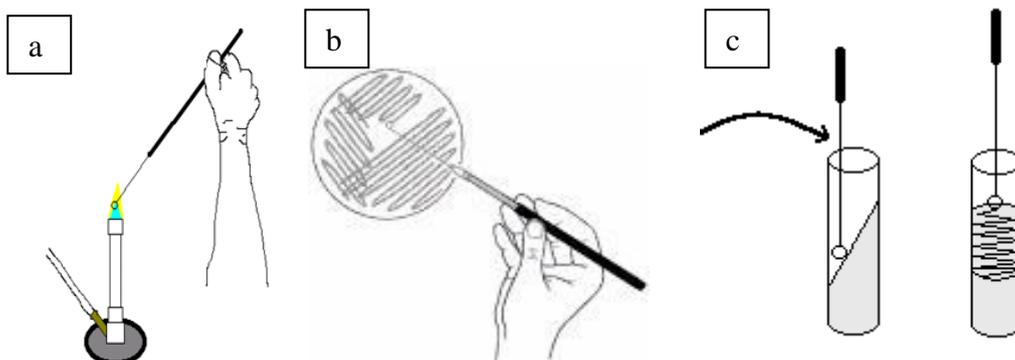
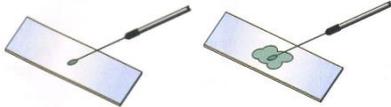


Figura 03. Preparo de estoque de micro-organismos em tubo inclinado a partir de colônias isoladas por estrias de esgotamento. a) Esterilização da alça, b) coleta de colônia isolada, c) inóculo por estrias no tubo inclinado.

2.2. Coloração de Gram

- a. Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água. Com a alça de platina, esterilizada, tocar levemente na superfície da colônia e emulsionar o material na gota de água (caso o microrganismo seja fornecido em suspensão, colocar uma gota desta sobre a lâmina).



- b. Deixar secar
c. Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.



- d. Com o esfregaço seco, cobrir com:

<p>violeta de genciana 1 min.</p>	}	DEPOIS DO MINUTO, ESGOTAR A LAMINA E, COBRIR COM SOLUÇÃO DE LUGOL
<p>LUGOL (SOL. IODO/IODETO) (1 min.)</p>		
<p>álcool até desprender corante</p>	}	LAVAR COM AGUA CORRIENTE E ADICIONAR FUCSINA
<p>fucsina ou safranina 30 seg.</p>		
<p>Absorver água suavemente</p>		

A violeta de genciana pode ser substituída por cristal violeta

- Examinar ao microscópio com a objetiva de imersão,
- Desenhar e descrever as estruturas observadas.

3. Questões para a próxima aula.

As questões valem 1,0 cada, a ser entregue por grupo e devem ser entregues antes da próxima aula prática.

- a) Qual a relação entre a coloração de Gram e a estrutura da parede??
b) Descreva a estrutura do peptidoglicano.
c) Como é a parede celular de bactérias do gênero *Mycobacterium*?