

## **BMM 0123 - Microbiologia Básica**

### **Ecologia de Ecossistemas - 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.

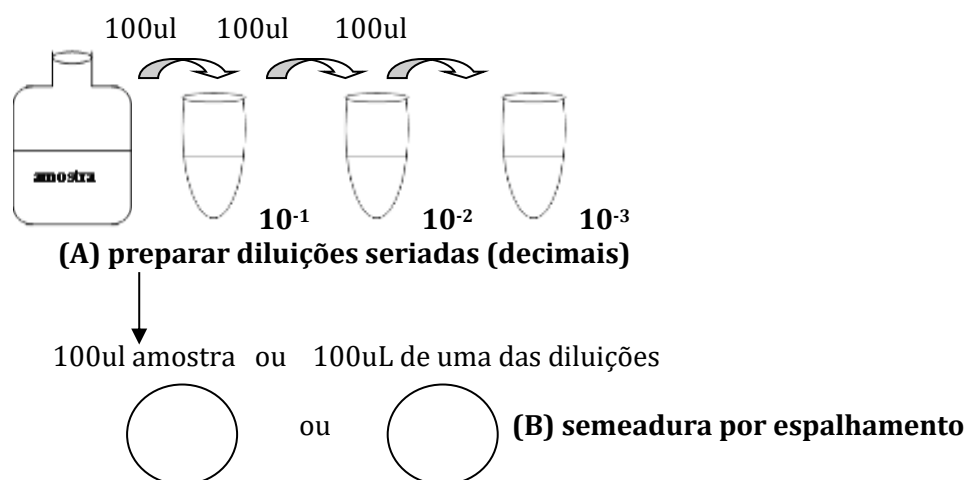
###### **2.2. Isolamento de micro-organismos (fungos e bactérias)**

###### **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  $\mu$ L em placas Petri\* contendo Meio de cultura TSA (10%) contendo fungicida ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 100  $\mu$ 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  $28^{\circ}\text{C}$  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

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



**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.

### 2.3. 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.

### 3. Questões para a próxima aula.

As questões valem 1,0 cada (deverão compor a nota do relatório), a ser entregue por grupo antes da próxima aula prática.

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

## **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.

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

## Prática 2: 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.

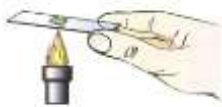
### 2. Procedimentos

#### 2.1. Coloração de Gram

- 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).



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



- Com o esfregaço seco, cobrir com:



A violeta de genciana pode ser substituída por cristal violeta

## 2.2. Observação ao microscópio

- 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*?

## **Prática 3 e 4. Isolamento de micro-organismos associados às plantas**

### **3.1. Isolamento de Micro-organismos epifíticos**

Essa técnica baseia-se na remoção parcial dos micro-organismos da superfície vegetal. Embora métodos de remoção de células aderidas por meio de sonicação ou agitação com sílica, a comunidade microbiana da superfície de tecidos vegetais pode ser amostrada por meio da técnica de carimbo. Para isso, a amostra vegetal deve ser pressionada sobre o meio de cultura (para bactérias - TSA - ou fungos - BDA), mantida por 1 minuto e posteriormente removida com auxílio de uma pinça.

Esta metodologia permite que células não aderidas à superfície sejam transferidas para o meio de cultura, onde após incubação a 28°C por até 7 dias, colônias microbianas não observadas.

### **3.2. Isolamento de Micro-organismos endofíticos**

#### **3.2.1. Desinfecção Superficial dos tecidos vegetais**

- a. Lavar as amostras em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo.
- b. Cortar as amostras em fragmentos de 8 a 12 cm.
- c. Pesar as amostras.
- d. Colocar imerso em álcool 70% por 1 min.
- e. Colocar imerso em hipoclorito de sódio, 2 - 4% de Cl - ativo por 3 min.
- f. Colocar imerso em álcool 70% por 30 seg.
- g. Enxaguar em água destilada e esterilizada.

#### **3.2.2. Técnicas de Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**

##### **3.2.2.1. Isolamento por Fragmentação**

Essa técnica baseia-se na fragmentação dos diferentes tecidos vegetais (ramos, folhas, raízes etc.), previamente desinfetados superficialmente. Embora seja mais utilizada para o isolamento de fungos, esta metodologia pode também ser aplicada para o isolamento de bactérias endofíticas. Basicamente, a técnica consiste em cortar os ramos e folhas em fragmentos de 0,5 cm e 0,5 cm<sup>2</sup>, respectivamente, e incubar os mesmos sobre meio de cultura específico. Eventualmente, para ramos, pode ser retirada a casca para evitar o crescimento de fungos decompositores que resistem ao processo de desinfecção.

Caso seja observado o aparecimento de micro-organismos de crescimento rápido até o segundo dia de incubação, os fragmentos que não apresentarem crescimento microbiano deverão ser transferidos para outra placa de Petri contendo meio de cultura e incubados nas mesmas condições.

Para o cálculo da frequência de isolamento (FI), ao final do isolamento deve-se avaliar o número de fragmentos que apresentaram crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos vegetais avaliados.

Por exemplo: foram observados 50 fragmentos foliares com crescimento fúngico em uma amostra de 80 fragmentos. Neste caso a frequência de isolamento é de:

$$FI = \frac{\text{No de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{No. total de fragmentos foliares}}$$

No. total de fragmentos foliares

$$FI = 50/80 = 0,625,$$

ou seja, 62,5% dos fragmentos apresentarem crescimento fúngico.

### 3.2.2.2. Isolamento por Trituração

Esta técnica baseia-se na liberação de células dos micro-organismos endofíticos por meio da trituração dos tecidos do hospedeiro em uma solução salina, tampão PBS ou meio de cultura. Neste processo, pode-se utilizar cadinho e pistilo ou um homogeneizador de células (tritador). Em ambos os casos, deve-se triturar de forma homogênea todas as amostras a serem analisadas, antes de se fazer diluições apropriadas para semeadura em meio de cultura.

Rotineiramente, é utilizado 1 g de tecido vegetal em 3 mL da solução. Aconselha-se manter esta correlação para evitar diluição dos endófitos e diminuir a probabilidade do isolamento de micro-organismos de baixa frequência. Alternativamente, antes da diluição e semeadura, a suspensão, contendo o tecido vegetal e os endófitos, pode ser incubada a temperatura ambiente, sob agitação (150 rpm), por 1-3 horas, a fim de permitir a completa liberação dos micro-organismos endofíticos dos tecidos do hospedeiro. Esta técnica permite o isolamento da comunidade microbiana total, independente da sua localização nos tecidos do hospedeiro, permitindo assim a sua quantificação.

A concentração de endófitos por grama de tecido vegetal fresco é calculada pelo número de colônias observado em cada diluição. Por exemplo:

1,2 g de tecido vegetal é triturado em 3 mL de tampão PBS

Desta suspensão, é feita uma diluição ( $10^{-1}$ )

São semeados 100  $\mu$ L desta suspensão  $10^{-1}$

Resultado:

Foram observadas 285 colônias na diluição  $10^{-1}$

Passo 1: Média das placas observadas:

$$285 \times 10 \text{ (diluição } 10^{-1}) = 2.850 \text{ colônias}$$

Passo 2:  $2.850 \times 10 = 28.500$  colônias / mL (foram semeados 100  $\mu$ L ou 0,1 mL)

Passo 3:  $28.500 \times 3$  (vol. total da solução utilizada para trituração) = 85.500

Passo 4:  $85.500 / 1,2$  (peso da amostra vegetal usada) = 71.250

Passo 5.  $71.250 = 7,125 \times 10^4$  ou aproximadamente  $7,13 \times 10^4$  unidades formadoras de colônia (UFC) / g de tecido