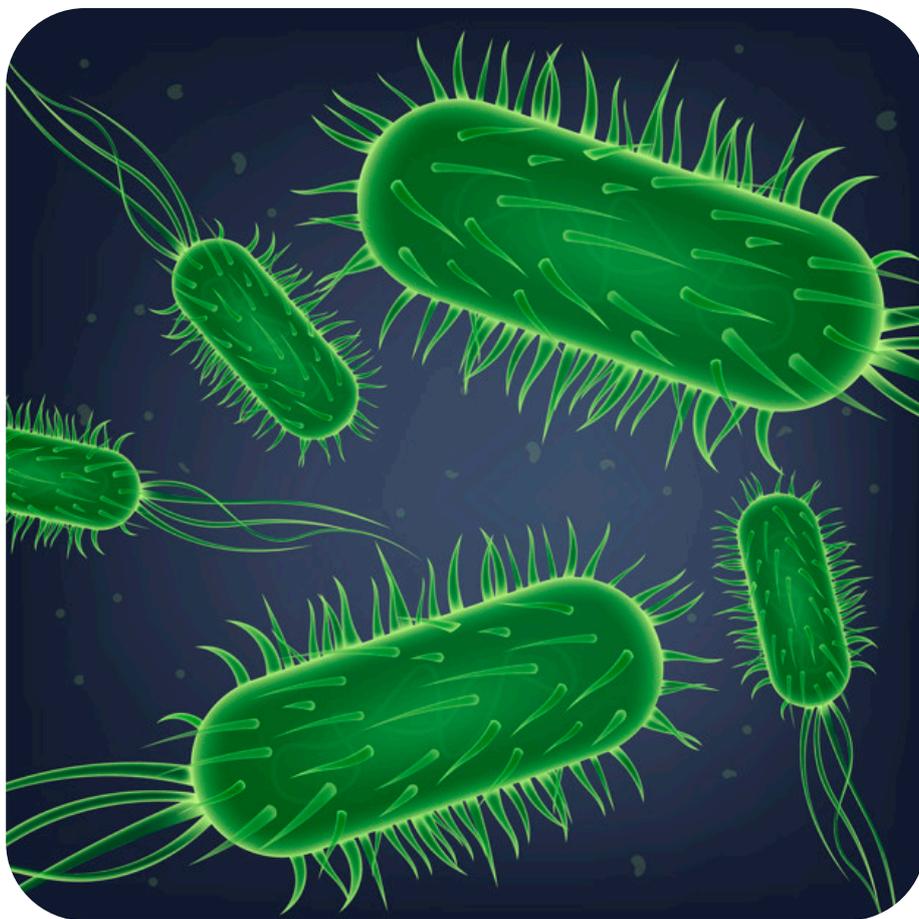


Roteiro de aulas práticas

Microbiologia Geral



2023

AUTORAS:

Professora Dra Carolina Kist Traesel

Maria Eduarda de Moraes Guerra e Raíssa Gasparetto

T764

Traesel, Carolina Kist

Roteiro de aulas práticas Microbiologia Geral [recurso eletrônico] / Carolina Kist Traesel, Maria Eduarda de Moraes Guerra, Raíssa Gasparetto. – Uruguiana: Universidade Federal do Pampa, 2023.

ISBN 978-65-00-81681-5

Inclui referências

Disponível em: <http://repositorio.unipampa.edu.br>

1. Microbiologia geral I. Guerra, Maria Eduarda de Moraes II. Gasparetto, Raíssa III. Título

CDU 579

SUMÁRIO

NORMAS DE SEGURANÇA DO LABORATÓRIO	4
RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	5
COLETA E SEMEADURA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS	8
COLETA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS	9
TÉCNICA DE ESGOTAMENTO POR ESTRIAS	10
TESTE DE ANTISSEPSIA.....	14
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE COLÔNIAS BACTERIANAS	15
RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	16
TÉCNICAS DE COLORAÇÃO NA BACTERIOLOGIA - COLORAÇÃO DE GRAM	19
TÉCNICAS DE COLORAÇÃO NA BACTERIOLOGIA	20
COLORAÇÃO DE GRAM	21
RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	25
TÉCNICAS DE SEMEADURA E CONTAGEM EM PLACA	28
TÉCNICAS DE SEMEADURA	29
MEDIDAS DIRETAS DO CRESCIMENTO MICROBIANO	33
ATIVIDADE	40
ANTIBIOGRAMA.....	43
ANTIBIOGRAMA	44
RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA	45
PRÍONS	47
PRÍONS.....	48
ATIVIDADE	49
CULTIVO CELULAR	51
CULTIVO CELULAR	52
ALGUMAS LINHAGENS CELULARES	54
ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR e EFEITO CITOPÁTICO	55
CULTIVO E ISOLAMENTO FÚNGICO.....	56
CULTIVO E ISOLAMENTO FÚNGICO	57
LEVEDURAS	58
FILAMENTOSOS	59
DIMÓRFICOS	63
ATIVIDADE	64
BIBLIOGRAFIA	66



NORMAS DE SEGURANÇA DO LABORATÓRIO

As aulas práticas de Microbiologia Geral têm como objetivo ensinar ao acadêmico os princípios gerais e métodos utilizados no estudo de microbiologia. Nestas aulas utilizaremos uma variedade de bactérias, sendo algumas patogênicas para o homem, portanto é essencial que as normas sejam seguidas, a fim de se evitar contaminações acidentais.

1. Na entrada do laboratório deve ser deixado todo o material (como mochilas e casacos) nos armários ou local indicado da sala, não é permitido deixar no chão ou sobre as bancadas.
2. O laboratório deve ser um recinto calmo, os alunos devem evitar conversar e sair de seus lugares desnecessariamente.
3. Para aula prática, é necessário apenas caneta e caderno. Na bancada de trabalho não deve haver acúmulo de objetos.
4. O uso de jaleco de mangas compridas e calçados fechados é obrigatório no laboratório de aulas práticas, a fim de proteger o aluno de possíveis contaminações ou acidentes.
5. Cabelos devem ser amarrados de forma a não interferir com reagentes e equipamentos.
6. Realizar a antissepsia das mãos ao iniciar a análise, ou seja lavar e passar álcool em gel, e ao final repetir. Se for portador de algum ferimento nas mãos, procurar não tocar no material ou usar luvas.
7. Identificar as amostras, bem como o material a ser utilizado antes de iniciar a análise.
8. Não comer, beber ou fumar no laboratório.
9. Não se debruçar sobre a bancada.
10. Manter canetas, dedos e outros longe da boca e olhos.
11. Não utilizar material de uso pessoal para limpar os objetos de trabalho.
12. Avisar ao professor em caso de contaminação acidental.
13. Depositar todo o material utilizado em recipiente adequado (descarte), jamais o deixando sobre a bancada.
14. Flambar as alças, agulhas e pinças antes e após o uso.
15. Trabalhar sempre próximo ao fogo.
16. Após o uso do microscópio, desliga-lo e limpa-lo. Não esquecer de retirar e devolver as lâminas.
17. Terminado o trabalho prático, deixar a bancada em ordem. O material contaminado nunca deve ser descartado na pia ou lixo. Deve-se observar orientação para esse fim.



RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

Instruções para desenvolver o relatório:

O relatório deve conter:

- a) Informações sobre a atividade da aula;
- b) Materiais utilizados;
- c) Métodos;
- d) Desenvolvimento das atividades;
- e) Explicação teórica da atividade realizada;
- f) Dados importantes, como temperatura, tempo, nomes dos materiais, etc.;
- g) Quando tiver orientações específicas para determinada aula, estas devem ser seguidas.

1. É importante, para fins avaliativos, que o relatório seja **manuscrito** e apresente letra legível.
2. Pode haver no relatório desenhos, tabelas, entre outros.
3. **O relatório deve ser entregue na próxima aula prática (ou conforme o cronograma do plano de ensino/Google Classroom), não sendo aceito após essa data.**
4. O relatório deve ser entregue nas folhas anexadas nesse documento. Assim, é preciso imprimir a folha e redigir **a mão**; ou caso tenha imprimido todo o caderno de roteiro, basta destacar a folha e recortar a lateral.
5. Se for entregue mais de duas folhas, estas devem estar **grampeadas**.

COLETA E SEMEADURA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS





COLETA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS

Assim como as análises microbiológicas num laboratório devem ser realizadas corretamente de modo que erros podem comprometer o diagnóstico e conseqüentemente o tratamento de um indivíduo, as etapas de coleta, transporte e armazenamento da amostra são também procedimentos importantes que devem ser o mais correto possível.

Se o processo de coleta, armazenamento e transporte não forem corretos, há grande chance de que, mesmo com uma análise laboratorial realizada com máxima excelência, os resultados sejam equivocados, podendo passar despercebidos no laboratório e assim causando sérias conseqüências.

Na aula prática, realizaremos uma coleta de amostra para posterior semeadura:

Para realizar a coleta, será usado:

- ✓ Um tubo com meio de transporte (para aula, usaremos Solução Salina a 0,9%. Para transportes mais demorados pode-se fazer uso de outro, como o meio Stuart, por exemplo)
- ✓ Um suabe estéril
- ✓ Luvas

Procedimento:

1. Abra o papel do suabe pela parte que não contém a haste de algodão.
2. Abra o tubo de Solução Salina a 0,9% e mergulhe a ponta do suabe que está com o algodão.
3. Retire o suabe e feche o tubo.
4. Passe girando o suabe na superfície da amostra. Colete uma porção significativa de toda a amostra.
5. Guarde o suabe dentro do tubo e leve ao laboratório.



TÉCNICA DE ESGOTAMENTO POR ESTRIAS

Antes de iniciar a técnica, tome cuidado com os seguintes tópicos:

- A agulha ou alça de platina devem ser esterilizadas por flambagem antes e após qualquer cultivo. Tome cuidado de esfriá-la antes da sementeira.
- Os recipientes devem sempre ser abertos próximo à chama da lamparina.
- Deve-se evitar ao máximo que as tampas dos tubos e placas fiquem sob a bancada durante o cultivo.

Para garantir uma sementeira correta, deve-se evitar ao máximo perfurar ou rasgar o ágar, pois poderá ocorrer acúmulo de bactérias neste setor do meio, além de alterar as condições de crescimento bacteriano.

A flambagem consiste em aquecer a alça de platina, por exemplo, na chama da lamparina até que esta fique vermelha incandescente. Além de flambar a alça, é preciso flambar todo o cabo, de modo a descontaminá-lo (este não precisa ficar vermelho), para realizar a técnica.

A técnica de esgotamento por estrias é um dos diversos métodos de sementeira empregado com frequência na rotina laboratorial. Nesta, são realizadas estriações no meio de cultivo sólido em placa de Petri.

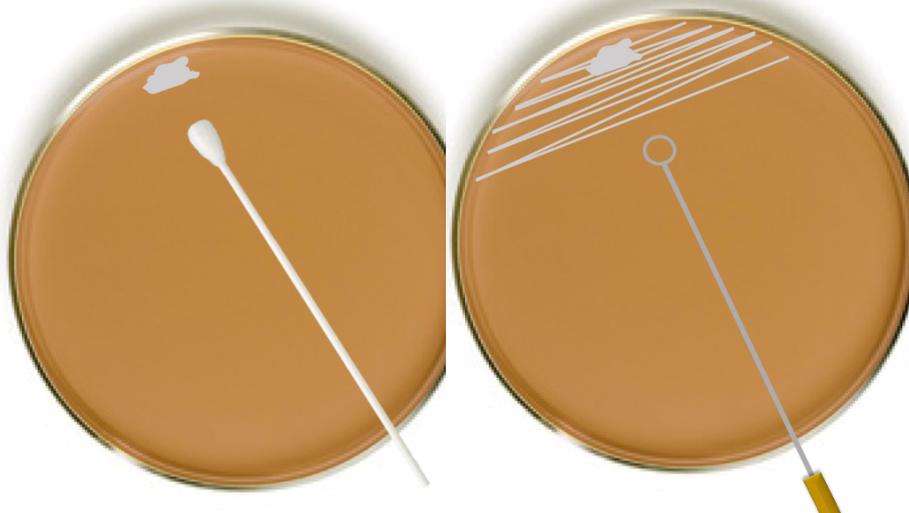
Objetivo: _____

Para realizar a técnica de sementeira em meio sólido, pode-se usar culturas a partir de placas de Petri, tubos de ensaio (como as amostras coletadas), microtubos, etc.

Para a técnica, use alça de platina esterilizada.

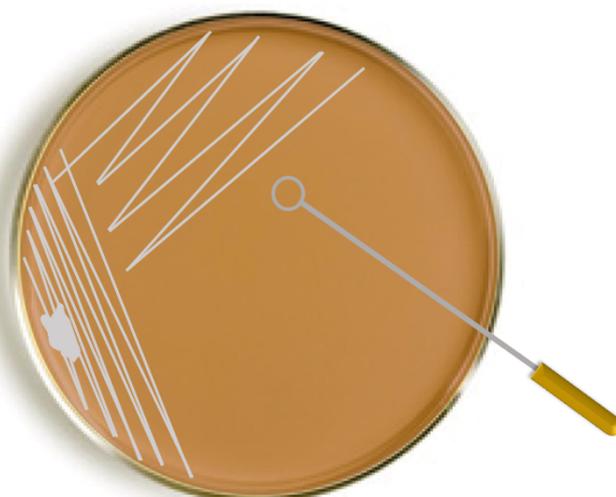
1. Retire o suabe do tubo de Solução Salina a 0,9%. Esprema-o gentilmente nas paredes do tubo para retirar o excesso de líquido, a fim de não pingar na bancada ou no meio.
2. Abra a placa de Petri próximo à chama, mantendo a tampa entreaberta ou na bancada ao lado da lamparina, virada para cima.
3. Divida a placa com ágar em 4 quadrantes (“imaginários”). Escolha o quadrante superior esquerdo para iniciar a sementeira. Na borda deste, fricção o suabe com o conteúdo da amostra.
4. A partir do local que foi posto a amostra com o suabe, inicie movimentos de “zig-zag”, girando o suabe, de forma delicada para não rasgar o ágar, indo em direção ao centro da placa. Faça os movimentos encostando nas paredes da placa e conforme for descendo para o centro, não retorne com as estrias para cima para não recarregar a alça. As estrias devem ser volumosas e com pouco espaço.
5. Feche a placa e queime a haste de algodão na chama da lamparina.

Obs.: O passo 4 pode ser realizado com a alça de platina. Neste caso, não esqueça de seguir os passos 7, 8 e 9 anteriormente.



Fonte: Autor.

6. Feche a placa e gire-a um pouco em sentido anti-horário.
7. Abra a placa de Petri, mantendo a tampa na bancada ao lado da lamparina, virada para cima.
8. Flambe a alça de platina na lamparina.
9. Esfrie a alça em um canto da placa, introduzindo-a no ágar sem estrias.
10. Puxe uma linha com alça de platina da estria anterior para a direita e inicie uma nova estria (movimentos de “zig-zag”, descendo para o centro da placa, sem voltar para cima e sem encostar na estria ao lado). Faça estrias um pouco mais afastadas que a anterior.



Fonte: Autor.

11. Feche a placa e gire-a um pouco em sentido anti-horário. Flambe a alça.
12. Esfrie a alça em um canto da placa, introduzindo-a no ágar sem estrias.
13. Puxe uma linha com alça de Platina da estria anterior para a direita e inicie uma nova estria (movimentos de “zig-zag”, descendo para o centro da placa, sem voltar para cima e sem encostar na estria ao lado. Faça estrias um pouco mais afastadas que a anterior.



Fonte: Autor.

14. Feche a placa e gire-a um pouco em sentido anti-horário. Flambe a alça.
15. Esfrie a alça em um canto da placa, introduzindo-a no ágar sem estrias.
16. Puxe uma linha com alça de Platina da estria anterior para a direita e inicie uma nova estria (movimentos de “zig-zag”, descendo para o centro da placa, sem voltar para cima e sem encostar na estria ao lado. Faça estrais um pouco mais afastadas que a anterior.

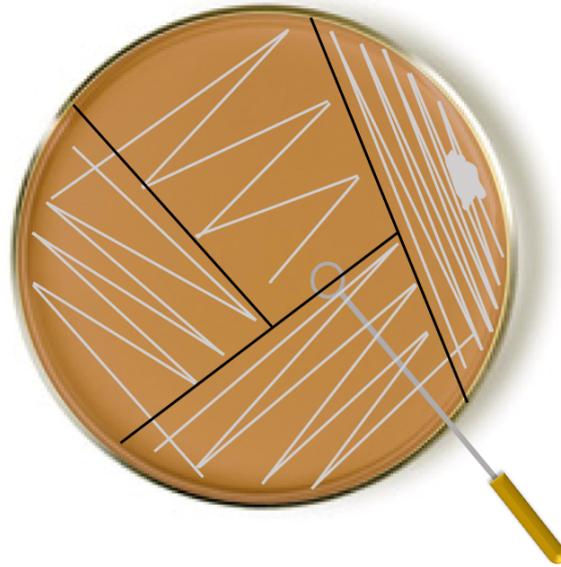


Fonte: Autor.

17. Feche a placa e flambe a alça.

Período e temperatura de incubação: _____

Obs.: Para ter uma delimitação e realizar as estrias com segurança, pode-se marcar com caneta permanente na parte inferior da placa linhas que ajudarão a guiar no momento da semeadura.



Fonte: Autor.

Resultado esperado:

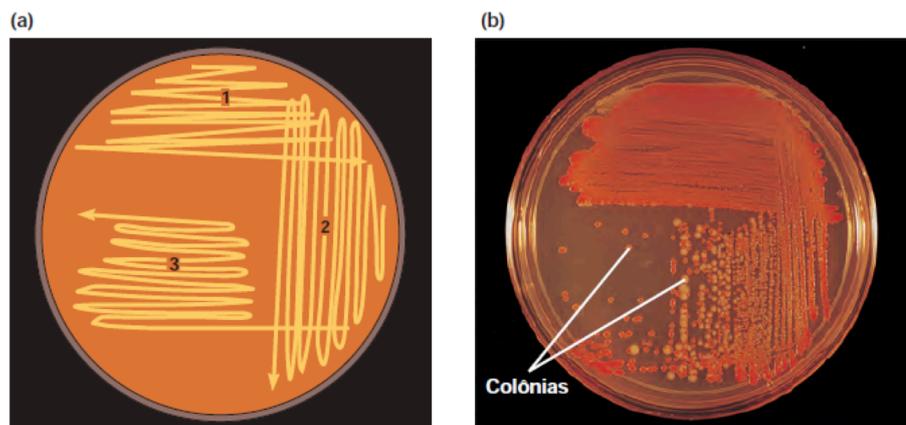


Figura 6.11 Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactérias. **(a)** As setas indicam a direção da semeadura por esgotamento. A série de estrias 1 é feita com a cultura bacteriana original. A alça de inoculação é esterilizada após cada série de estrias. Nas séries 2 e 3, a alça retira bactérias da série anterior, reduzindo cada vez mais o número de células. Há inúmeras variações dessa técnica. **(b)** Na série 3, observe que foram obtidas colônias de bactérias bem isoladas de dois tipos diferentes, vermelho e amarelo.

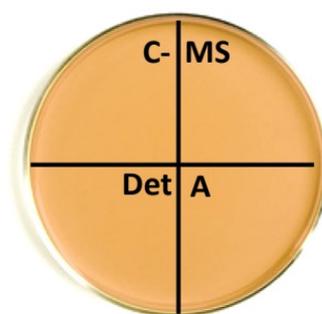
Fonte: TORTORA, G.J. et al., 2010.

TESTE DE ANTISSEPSIA

O experimento que será realizado tem por objetivo verificar a ação de antissépticos sobre a microbiota das mãos, para tanto devem ser seguidas as seguintes etapas:

1) Pegar uma placa de Petri contendo ágar e dividi-la em 4 partes iguais com uma caneta permanente, assim como mostra na figura abaixo.

2) Identificar cada quadrante com os respectivos títulos: Controle (C), Mão Suja (MS), Detergente (Det) e Álcool 70% (A).



Fonte: Autor

3) No quadrante identificado como “Mão Suja” um aluno deve encostar o dedo (sem lavar) no ágar por 1 minuto.

4) A seguir o mesmo aluno deve lavar as mãos com detergente, secá-las levemente e encostar o mesmo dedo no quadrante do ágar identificado como “Detergente” por 1 minuto.

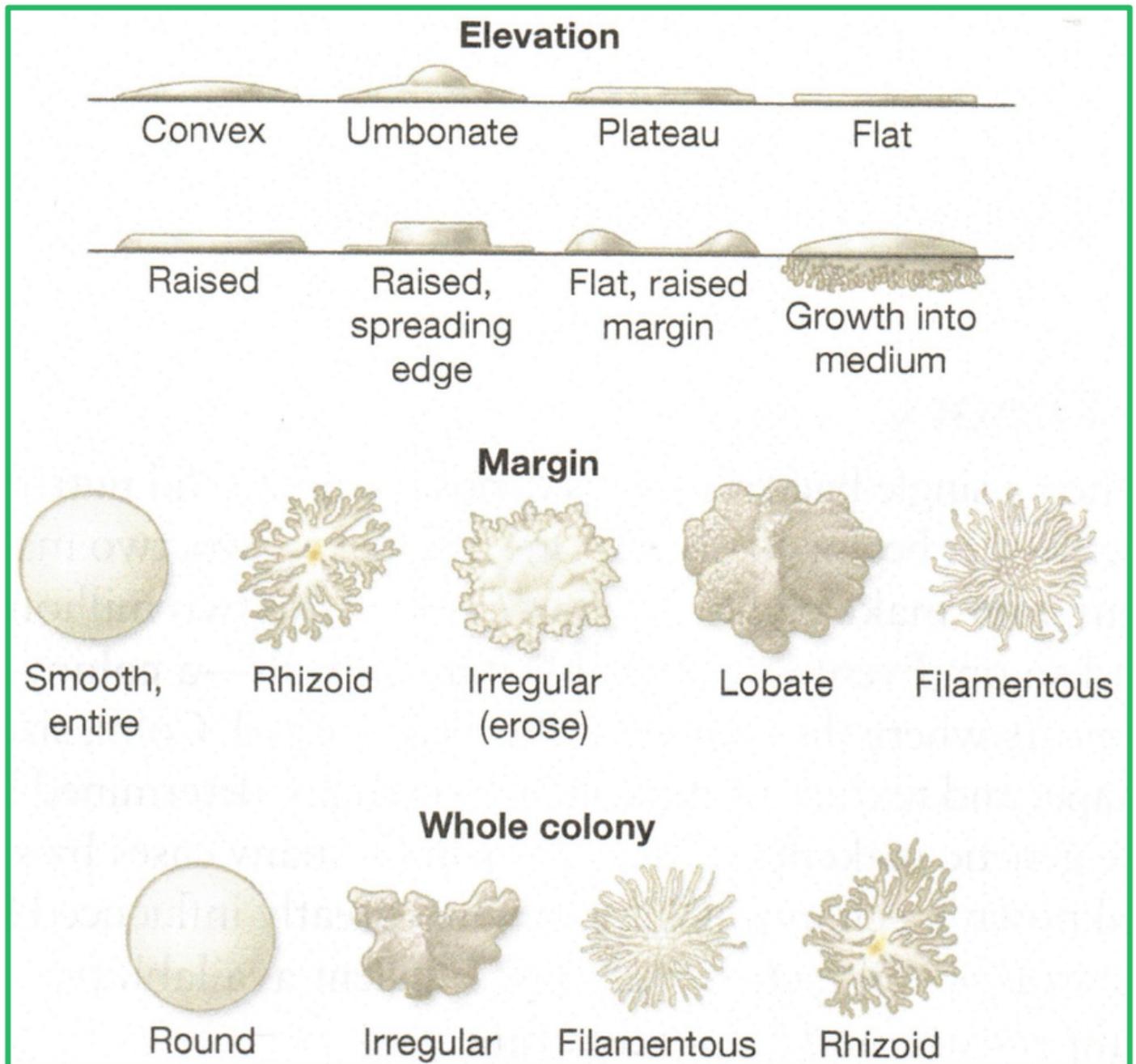
5) O mesmo aluno deve então lavar as mãos com álcool, secá-las e encostar o mesmo dedo no quadrante do ágar identificado como “álcool” por 1 minuto.

6) A placa deve ser levada para incubação à 37°C, por 24 horas.

OBS: Nada deve encostar no quadrante identificado como “Controle”. Este servirá como teste de assepsia.

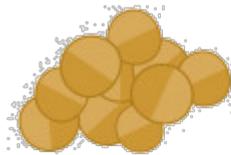
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE COLÔNIAS BACTERIANAS

Os termos na figura são usados para descrever morfologicamente colônias bacterianas. As descrições também podem incluir cor, odor, tamanho, características da superfície, textura e propriedades ópticas (opacas ou translúcidas).

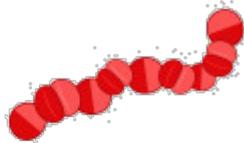


Fonte: LEBOFFE, M. J., PIERCE, B. E. (2015).

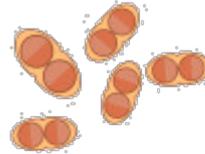
TÉCNICAS DE COLORAÇÃO NA BACTERIOLOGIA - COLORAÇÃO DE GRAM



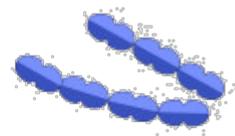
Staphylococcus aureus



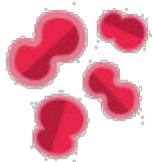
Staphylococcus pyogenes



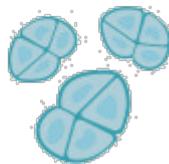
Staphylococcus pneumoniae



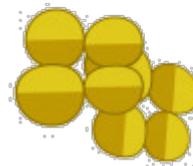
Enterococcus



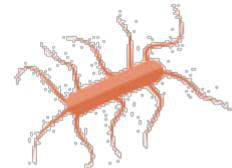
Neisseria gonorrhoeae



Tetracoccus



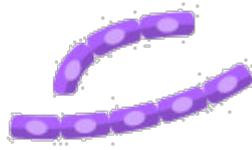
Sarcina



Salmonella



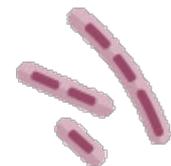
Enterobacteriaceae



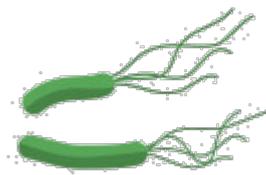
Bacillus anthracis



Bacillus tuberculosis



Klebsiella pneumoniae



Helicobacter pylori



Corynebacterium diphtheriae



Clostridium botulinum



Escherichia coli



TÉCNICAS DE COLORAÇÃO NA BACTERIOLOGIA

A coloração na bacteriologia é uma técnica extremamente valiosa para a observação das células bacterianas, suas estruturas, tamanho e formato. Além disso, auxilia no diagnóstico e tratamento.

Em uma coloração com a utilização de corantes, os microrganismos são corados, após serem mortos pelas interações químicas que muitas vezes podem ocorrer com auxílio de calor, como o chamado esfregaço em lâmina. Assim, quando utilizamos material fixado e corado, temos várias vantagens, pois além de as células ficarem mais visíveis após a coloração, podemos transportar estas lâminas sem risco (pois o material está fixado).

As técnicas de coloração podem ser: simples, diferencial ou especial.

Simple: É uma solução aquosa ou alcoólica de um único corante básico. Embora diferentes corantes se liguem especificamente a diferentes partes das células, o objetivo primário de uma coloração simples é destacar todo o microrganismo, para que as formas celulares e as estruturas básicas fiquem visíveis.

Diferencial: Ao contrário das colorações simples, as colorações diferenciais reagem de modo distinto com diferentes tipos de bactérias, podendo assim ser usadas para diferenciá-las. As colorações diferenciais mais frequentemente utilizadas para bactérias são a coloração de Gram e a coloração álcool-ácido resistente.

Especial: As colorações especiais são usadas para corar e isolar partes específicas dos microrganismos, como os endosporos e os flagelos, e para revelar a presença de cápsulas.

COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, por Hans Christian Gram. É um dos procedimentos de coloração mais utilizados, a qual classifica as bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram positivas, ou Gram (+), e as bactérias Gram negativas, ou Gram (-).

A parede celular de bactérias Gram-positivas difere-se das bactérias Gram-negativas pela presença de uma espessa camada de peptidoglicano e pela ausência de uma membrana externa. Esta diferença de constituição da parede celular é a base da coloração de Gram, uma técnica primordial no diagnóstico microbiológico, visto que através dela se definem características morfológicas e tintoriais da bactéria em pesquisa.

Prática 1

PREPARAÇÃO DO ESFREGAÇO E FIXAÇÃO DA AMOSTRA PARA COLORAÇÃO

Para realizar a coloração, é necessário fixar a amostra de microrganismo em lâmina com auxílio de fogo. A fixação evita que as células dos microrganismos sejam lavadas e perdidas durante o processo de coloração. Além disto, a fixação permite a aderência das células à lâmina,

Para isso precisamos de:

- ✓ Lâmina de vidro
- ✓ Lamparina
- ✓ Alça de platina
- ✓ Água destilada
- ✓ Pipeta de Pasteur de plástico
- ✓ Culturas bacterianas sólida e/ou líquida



Esfregaço da cultura bacteriana sólida

Procedimento:

1. Pegue uma lâmina de vidro limpa e no seu canto, na região fosca, identifique-a com seu nome.
2. Com a pipeta de Pasteur, pegue um pouco de água destilada.
3. Pingue uma pequena gota sobre a lâmina, bem no centro.
4. Flambe alça de Platina, resfrie e retire uma porção de uma colônia isolada da placa de Petri.
5. Leve a amostra da colônia cuidadosamente sobre a gota d'água na lâmina e, homogenize com movimentos circulares, para obter um esfregaço de forma oval, uniforme e fino.
6. Flambe a alça de Platina.
7. Fixe o esfregaço passando a lâmina na chama da lamparina. Passe e retire rapidamente. Repita o movimento até secar por completo. Atente para a lâmina não superaquecer, pois corre o risco de quebrar.

Esfregaço da cultura bacteriana líquida

Procedimento:

1. Para o esfregaço com cultura líquida, apenas colete com a pipeta de Pasteur uma pequena gota da amostra e deposite na lâmina, e homogenize com movimentos circulares, para obter um esfregaço de forma oval, uniforme e fino.

Prática 2 COLORAÇÃO

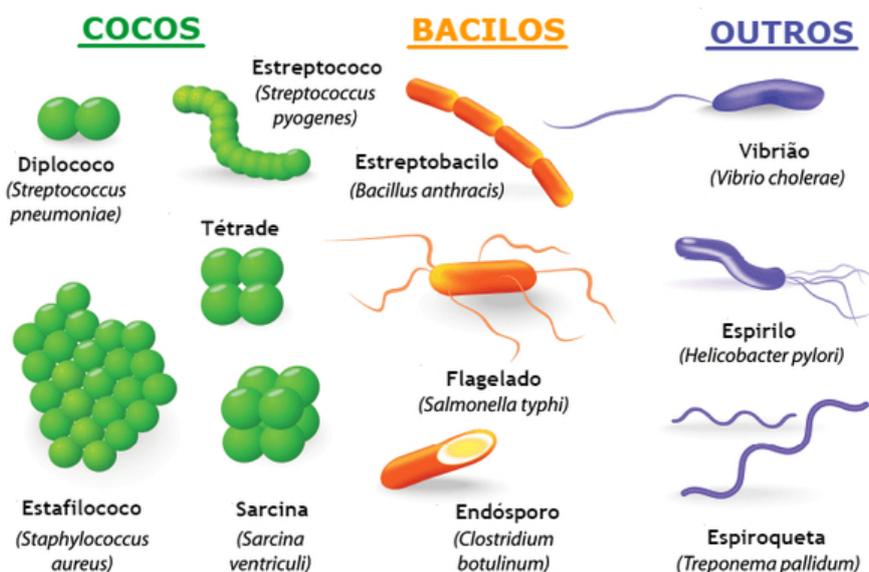
1. Sobre a bandeja/placa de descarte, posicione a lâmina em cima dos bastões com o esfregaço para cima.
2. Cubra toda a parte do esfregaço com o corante Cristal violeta e deixe agir por 1 minuto.
3. Em seguida lave a lâmina com água destilada.
4. Cubra toda a parte do esfregaço com o mordente Lugol (ou Iodo) e deixe agir por 1 minuto.

5. Em seguida lave a lâmina com água destilada.
6. Cubra toda a parte do esfregão com Álcool-acetona (agente descolorante) e deixe agir por 15 segundos.
7. Em seguida lave a lâmina com água destilada.
8. Cubra toda a parte do esfregão com o contracorante Fuscina/Safranina e deixe agir por 15 segundos.
9. Em seguida lave a lâmina com água destilada. Seque a parte inferior da lâmina com papel-toalha e aguarde a parte superior secar no ambiente ou seque-a com o auxílio de um secador.

Prática 3

MICROSCOPIA

1. Leve a lâmina ao microscópio óptico e com o auxílio de uma gota de óleo para imersão sobre o esfregão, observe na objetiva de 100x. Visualize as características morfotintoriais das células bacterianas.



Fonte: www.realizeeducacao.com.br/wiki/bacterias-e-archeas-mestres-da-adaptacao/

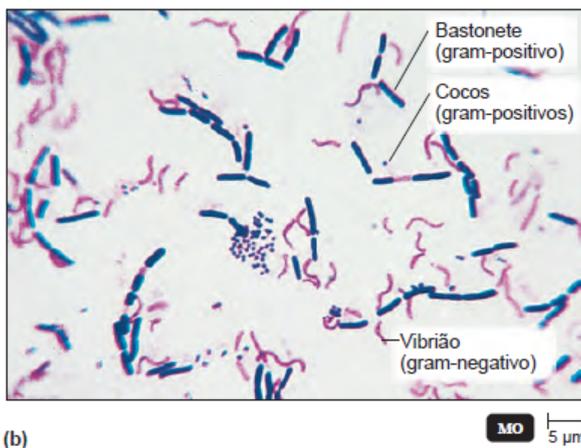
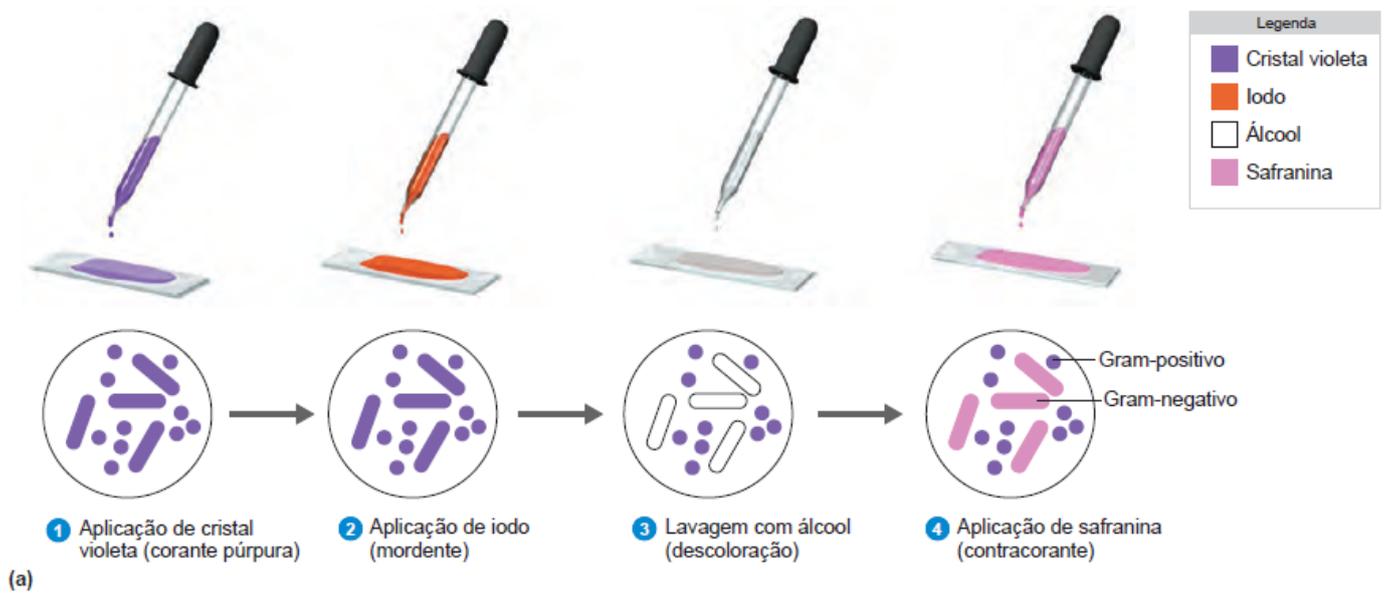
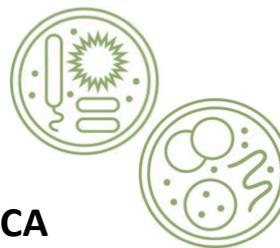


Figura 3.12 Coloração de Gram. (a) Procedimento. (b) Micrografia de bactérias coradas pelo Gram. Os bastonetes e os cocos (roxo) são gram-positivos, e os vibriões (rosa) são gram-negativos.

Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)



Microbiologia Geral
 Universidade Federal do Pampa
 Campus Uruguaiana
 Medicina Veterinária
 Profª Carolina Kist Traesel



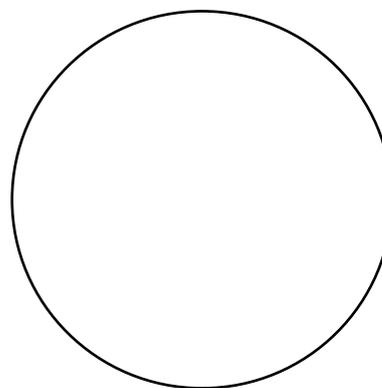
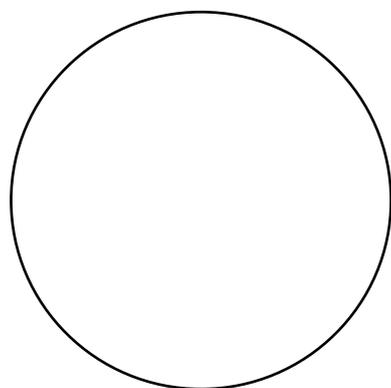
RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA

Nº		Data	/	/	Turma	
Nome (s)						
Matrícula (s)						
Atividade realizada						

→ Para ajudar você a fixar o conteúdo, foram elaboradas algumas perguntas a respeito desta aula. Responda-as e entregue junto ao relatório da aula prática

→ Descrição da atividade realizada (conforme instruções iniciais):

1. Fale sobre o fundamento da técnica de Gram e por que a coloração de Gram é tão útil?
2. Qual o objetivo do descolorante na coloração de Gram?
3. Faça um desenho esquemático do que foi visualizado no microscópio, mostrando a morfologia bacteriana e a reação tintorial de duas lâminas com resultados diferentes:



TÉCNICAS DE SEMEADURA E CONTAGEM EM PLACA



TÉCNICAS DE SEMEADURA

A escolha da técnica para o cultivo de microrganismos varia de acordo com o tipo de meio de cultura e a finalidade do cultivo, porém algumas regras devem ser seguidas nas inoculações:

- A agulha ou alça de Platina devem ser esterilizadas por flambagem antes e após qualquer cultivo. Tome cuidado de esfriá-las antes da coleta.
- Os recipientes devem sempre ser abertos próximos à chama da lamparina.
- Deve-se evitar ao máximo que as tampas dos tubos e placas fiquem sob a bancada durante o cultivo.

Para garantir uma semeadura correta, deve-se evitar ao máximo perfurar ou rasgar o ágar, pois poderá ocorrer acúmulo de bactérias neste setor do meio além de alterar as condições de crescimento bacteriano.

A flambagem consiste em aquecer a alça de Platina, por exemplo, na chama da lamparina até que essa fique vermelha incandescente. Além de flambar a alça, é preciso flambar todo o cabo, de modo a deixar este apenas descontaminado e não vermelho para realizar a técnica.

Técnica 1: Meio Líquido

Objetivo: _____

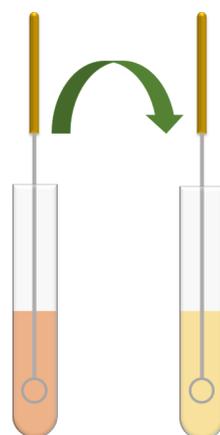
Para realizar a técnica de semeadura em meio líquido, pode-se usar culturas de placa de Petri, tubos de ensaio, microtubos, etc.

Para a técnica, use alça de Platina esterilizada.

1. Flambe a alça de platina na lamparina.
2. Abra o tubo contendo a cultura de bactérias perto da chama. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
3. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
4. Com a alça de Platina sempre perto da chama, introduza-a dentro do tubo e esfrie-a nas paredes por dentro antes de mergulhar no conteúdo.
5. Retire a alça do tubo e mantenha os dois perto do fogo.
6. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.
7. Abra o seguinte tubo onde será inoculada a amostra. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
8. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
9. Com a alça de Platina sempre perto da chama, introduza-a no tubo e mergulhe-a dentro do líquido, agitando-a nele.
10. Retire a alça, batendo-a nas paredes do tubo para tirar o excesso. Flambe-a.

11. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.

12. Agite um pouco o tubo, sem virá-lo de cabeça para baixo para que o líquido não encoste a tampa.



Fonte: Autor.

Período e temperatura de incubação:

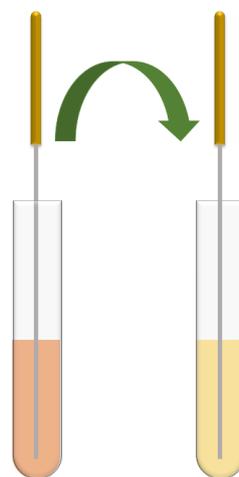
Técnica 2: Meio semi-sólido

Objetivo: _____

Para realizar a técnica de semeadura em meio semi-sólido, pode-se usar culturas de placa de Petri, tubos de ensaio, microtubos, etc.

Para a técnica, use agulha de Platina esterilizada.

1. Flambe a agulha de platina na lamparina.
2. Abra o tubo contendo a cultura de bactérias perto da chama. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
3. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
4. Com a agulha de Platina sempre perto da chama, introduza-a dentro do tubo e esfrie-a nas paredes por dentro antes de mergulhar no conteúdo.
5. Retire a agulha do tubo e mantenha os dois perto do fogo.
6. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.
7. Abra o seguinte tubo onde será inoculada a amostra. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
8. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
9. Com a agulha de Platina sempre perto da chama, introduza-a no tubo e faça apenas uma "injeção" no meio de cultivo semi-sólido, centralmente.
10. Retire a agulha. Flambe-a.
11. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.



Fonte: Autor.

Período e temperatura de incubação:

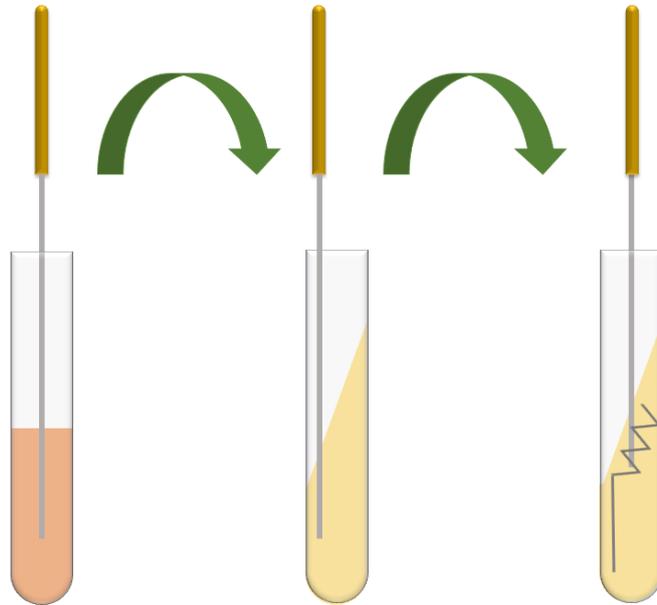
Técnica 3: Meio sólido (ágar inclinado)

Objetivo: _____

Para realizar a técnica de semeadura em meio sólido com ágar inclinado, pode-se usar culturas de placa de Petri, tubos de ensaio, microtubos, etc.

Para a técnica, use agulha de Platina esterilizada.

1. Flambe a agulha de platina na lamparina.
2. Abra o tubo contendo a cultura de bactérias perto da chama. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
3. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
4. Com a agulha de Platina sempre perto da chama, introduza-a dentro do tubo e esfrie-a nas paredes por dentro antes de mergulhar no conteúdo.
5. Retire a agulha do tubo e mantenha os dois perto do fogo.
6. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.
7. Abra o seguinte tubo onde será inoculada a amostra. A tampa deve ficar perto da chama, segurada na mão ou sobre a bancada.
8. Flambe ligeiramente a boca do tubo e o mantenha perto da chama.
9. Com a agulha de Platina sempre perto da chama, introduza-a no tubo e faça apenas uma "injeção" no meio de cultivo sólido, na base da inclinação ou na parte mais baixa da inclinação.
10. Em seguida, suba a alça e, conforme irá subindo, faça uma estria em "zig-zag" desde a base até o ápice da inclinação, sem voltar as estrias para baixo.
11. Retire a agulha. Flambe-a.
12. Flambe de novo a boca do tubo e feche-o com a tampa.



Fonte: Autor.

Período e temperatura de incubação:

OBS.: Pode-se realizar a semeadura apenas superficial em meio sólido inclinado, utilizando-se alça de Platina para fazer os movimentos de “zig-zag” (estriamento). Ainda, pode-se realizar a semeadura em meio sólido reto (não inclinado), por meio da “injeção” central da amostra com agulha de Platina.



MEDIDAS DIRETAS DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Para se medir o crescimento de populações microbianas, há diversos métodos que podem ser utilizados. Assim, conforme o escolhido, pode-se medir o número de células, a massa total da população (que muitas vezes é proporcional ao número de células).

Normalmente, quando queremos determinar uma população de microrganismos, os valores registrados são: número de células por mililitro de líquido ou grama de material sólido. Como essas populações geralmente são muito grandes, a maioria dos métodos de contagem tem como base enumerações diretas ou indiretas de amostras pequenas, para que no fim, um cálculo determine o tamanho total da população primária.

Exemplo: Vamos assumir, por exemplo, que em um milionésimo de mililitros (10^{-6} mL) de leite azedo conte 70 bactérias. Portanto, deve existir 70 vezes mais células, ou 70 milhões de células por mililitro. No entanto, não é prático medir em um milionésimo de mililitro ou de grama de alimento. Assim, o procedimento é feito indiretamente em uma série de diluições. Por exemplo, se adicionamos 1 mL de leite em 99 mL de água, cada mililitro dessa diluição terá um centésimo das bactérias que um mililitro da amostra original tinha. Realizando uma série de diluições, podemos rapidamente estimar o número de bactérias da amostra original.

Para contar as populações microbianas em alimentos sólidos (como carnes), uma parte do alimento será misturada com nove partes de água formando um homogenado. Amostras da diluição inicial de 100 vezes podem ser transferidas com uma pipeta para diluições posteriores ou contagem de células.

Contagem em placas

Conseguimos obter números de populações a partir da contagem em placas. Esse método mede o número de células viáveis logo após um período de incubação de no mínimo 24 horas para formação das colônias; apesar da desvantagem do tempo, esse método ainda é frequentemente utilizado.

Cada bactéria viva cresce e se divide e assim forma, uma colônia que, são contadas individualmente nesse método, assim sendo chamadas de **unidades formadoras de colônias (UFC)**. Para realizar a contagem com um valor fidedigno à amostra primária, é preciso que cresça um número limitado de colônias na placa, pois quando muitas estão presentes, algumas células são reprimidas e não podem se



desenvolver. Obviamente, isso não produz uma placa adequada para contagem; essas condições causam imprecisão na contagem. A *Food and Drug Administration* recomenda para a contagem, somente as placas que



tenham de 25 a 250 colônias, mas muitos microbiologistas preferem placas com 30 a 300 colônias. Para assegurar que algumas contagens de colônias estejam nessa faixa, o inóculo inicial é diluído várias vezes, em um processo chamado de **diluição seriada**.

Diluições seriadas

Digamos, por exemplo, que uma amostra de leite contém 10.000 bactérias por mililitro. Se 1 mL dessa amostra fosse semeado em placa, teoricamente 10.000 colônias deveriam se formar no meio da placa de Petri. Obviamente, isso não produziria uma placa contável. Se 1 mL dessa amostra fosse transferido para um tubo contendo 9 mL de água estéril, cada mililitro do fluido dentro do tubo conteria 1.000 bactérias. Se 1 mL dessa amostra fosse inoculado em uma placa de Petri, ainda teriam colônias demais na placa para a realização da contagem. Portanto, outra diluição deveria ser feita. Um mililitro contendo 1.000 bactérias deveria ser transferido para um segundo tubo de 9 mL de água. Cada mililitro nesse tubo conteria agora somente 100 bactérias, e se 1 mL do conteúdo do tubo fosse inoculado em placa, 100 colônias potenciais seriam formadas, um número facilmente contável.

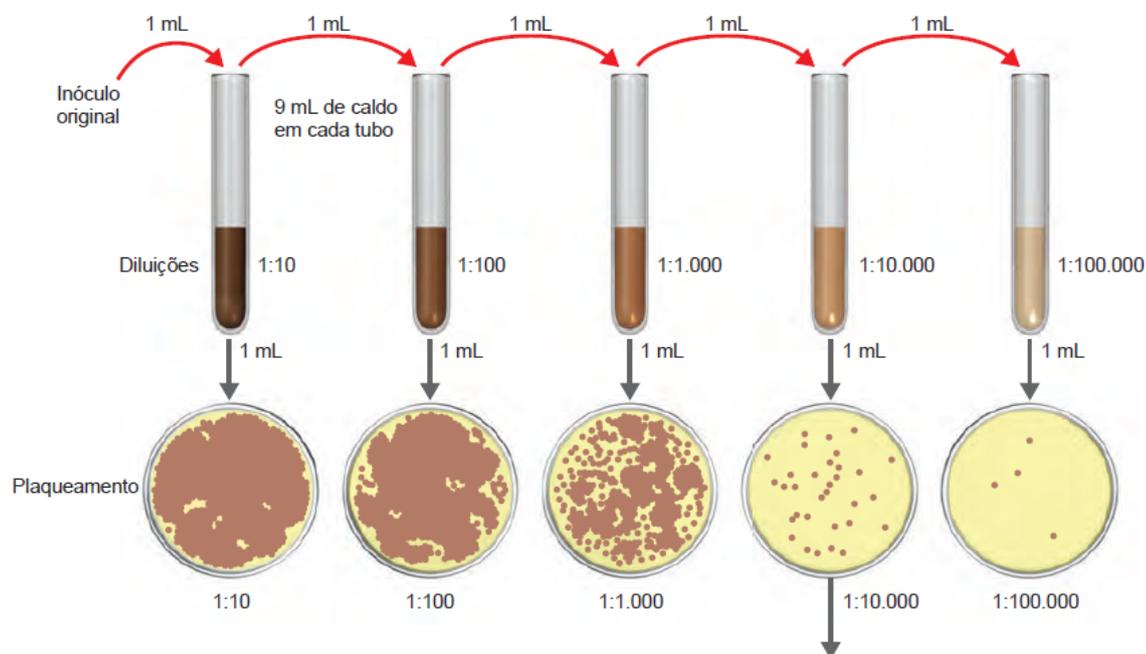
Diluições

Para realizar as diluições seriadas, será usado:

- ✓ Uma amostra de leite de 70 ml
- ✓ Pipeta de 1000 μ L
- ✓ Ponteiras de 1000 μ L
- ✓ Tubos de ensaio com 9 ml de Solução salina a 0,9%
- ✓ Lamparina
- ✓ Um agitador

Procedimento:

1. Antes de iniciar o procedimento, escreva com uma caneta permanente nos tubos de SS 0,9% a numeração da diluição, como por exemplo: tubo da primeira diluição = -1, assim por diante.
2. Com a lamparina acesa, deixe a caixa de ponteiros perto e a pipeta também. A caixa de ponteiros deve permanecer fechada e só pode ser aberta do lado da chama da lamparina e fechada logo em seguida.
3. Calibre a pipeta para 1000 μ l.
4. Retire uma ponteira.
5. Abra o recipiente contendo o leite perto da chama da lamparina.
6. Retire cuidadosamente 1000 μ l da amostra e feche o recipiente.
7. Mantenha a pipeta com a ponteira perto da chama.
8. Pegue o tubo -1, abra-o ao lado da chama e flambe a boca do tubo.
9. Pipete (descarregue) toda a amostra no tubo. Flambe a boca e feche.
10. Descarte a ponteira.
11. Agite o tubo no vórtex (agitador) sem o virar de cabeça para baixo.
12. Retire outra ponteira.
13. Abra o tubo -1 perto da chama da lamparina.
14. Retire cuidadosamente 1000 μ l da amostra e feche o tubo.
15. Mantenha a pipeta com a ponteira perto da chama.
16. Pegue o tubo -2, abra-o ao lado da chama e flambe a boca do tubo.
17. Pipete (descarregue) toda a amostra no tubo. Flambe a boca e feche.
18. Descarte a ponteira.
19. Agite o tubo no vórtex (agitador) sem o virar de cabeça para baixo.
20. Continue as diluições dessa forma até chegar ao tubo -7.



Cálculo: número de colônias na placa \times índice de diluição da amostra = número de bactérias/mL (p. ex., se 32 colônias estão na placa de diluição 1:10.000, a contagem pode ser estimada em $32 \times 10.000 = 320.000$ bactérias/mL na amostra).

Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)

Logo após as diluições, um mililitro ou 0,1 ml de cada tubo são suspensos em placas de Petri com meio de cultivo sólido para depois de um determinado período poderem ser contadas as UFC's.

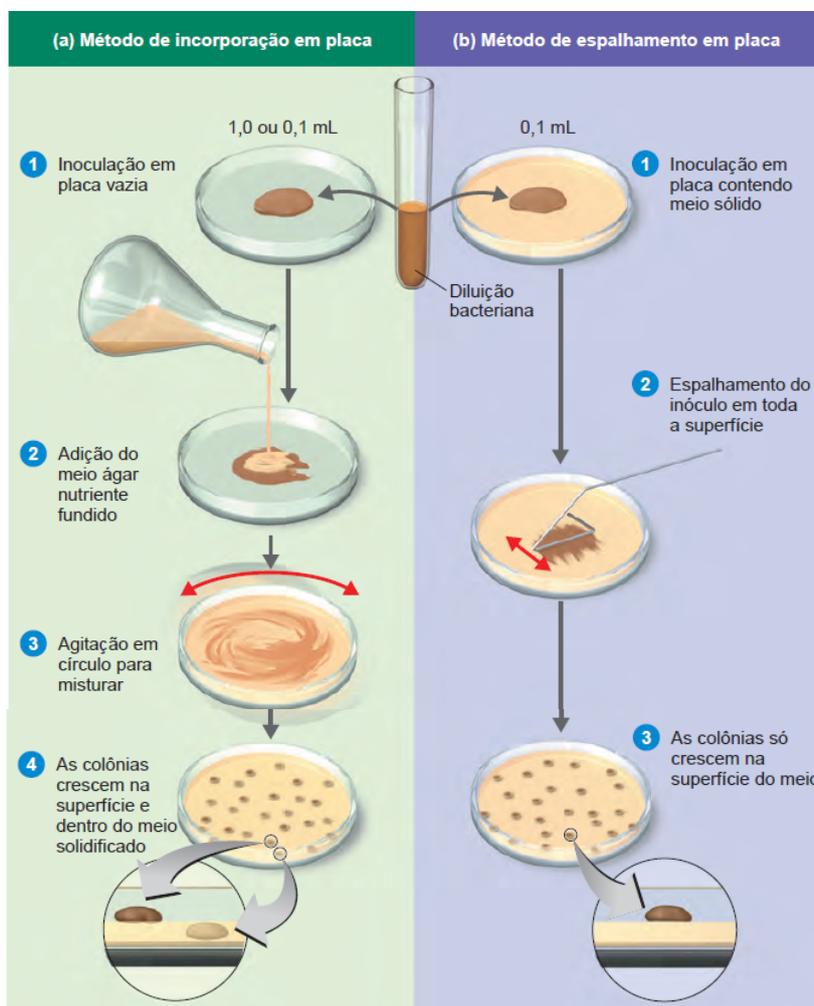
Para suspender na placa há dois métodos, o de incorporação em placa e o de espalhamento em placa, também chamados de *pour-plate* e *spread-plate*, respectivamente.

Incorporação em placa (*pour-plate*) e espalhamento em placa (*spread-plate*)

Pour-plate - Um mililitro das diluições da suspensão bacteriana é introduzido em uma placa de Petri. O meio de cultivo, no qual o ágar é mantido líquido por aquecimento em banho-maria a 50°C, é vertido sobre a amostra, que é então misturada com o meio por agitação lenta da placa. Quando o ágar solidifica, a placa é incubada. Com a técnica de incorporação em placas, as colônias crescerão tanto dentro do ágar quanto na superfície da placa.

Spread-plate - Um inóculo de 0,1 ml é adicionado à superfície de um ágar previamente solidificado. O inóculo é então espalhado de modo uniforme na superfície do meio com um bastão de vidro (alça de

Drigalski) esterilizado. Esse método espalha todas as colônias na superfície e evita o contato entre as células e o ágar fundido.



Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)

Semeadura em placa

Após a diluição seriada, uma amostra dos tubos será passada para placas de Petri pelo método *Spread-plate*, em que o ágar já está na placa e o espalhamento é em superfície.

É necessário para esse método:

- ✓ Placas de Petri com meio de cultivo *Plate Count Agar*
- ✓ Pipeta de 100 μL
- ✓ Ponteiros de 100 μL
- ✓ Alça de Drigalski
- ✓ Lamparina



Procedimento:

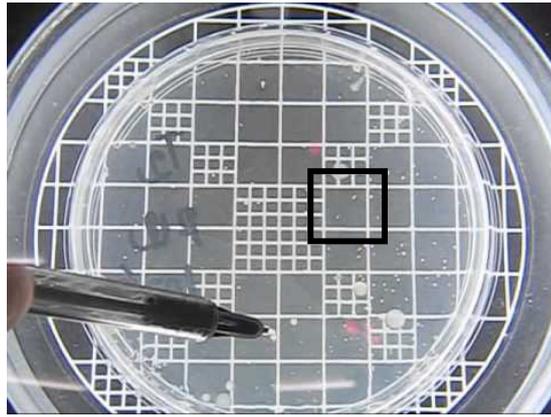


1. Antes de iniciar o procedimento, escreva com uma caneta permanente na tampa das placas de Petri a numeração da diluição, como por exemplo: placa da primeira diluição = **-1**, assim por diante.
2. Com a lamparina acesa, deixe a caixa de ponteiras perto e a pipeta também. A caixa de ponteiras deve permanecer fechada e só pode ser aberta do lado da chama da lamparina e fechada logo em seguida.
3. Agite o tubo de diluição **-1**.
4. Calibre a pipeta para 100 µl.
5. Retire uma ponteira.
6. Abra o tubo de diluição **-1**.
7. Retire cuidadosamente 100 µl do tubo **-1** e feche-o.
8. Mantenha a pipeta com a ponteira perto da chama.
9. Pegue a placa **-1** e a abra ao lado da chama e pipete o conteúdo na superfície do ágar.
10. Com auxílio da alça de Drigalski flambada ou estéril, espalhe o volume uniformemente na superfície do ágar.
11. Realizar o espalhamento nas outras placas, ocupando uma ponteira nova para cada diluição.
12. Incubar a 37 graus por 24 horas.

Leitura

Após o crescimento, é necessário fazer a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC'S) em cada Placa. Para isso, usa-se um contador de colônias disponibilizado na aula.

Para realizar a contagem, coloque a placa sobre o contador e com uma caneta permanente marque as colônias já contadas. As placas para contagens viáveis estão entre 25 a 250 UFC's, acima de 250, é necessário selecionar 4 quadrados de 1 cm³ do contador de colônias para conta-los. Quando isso for necessário, fazemos a contagem das UFC's dentro do quadrado e também em cima de 2 das 4 linhas que os delimitam.



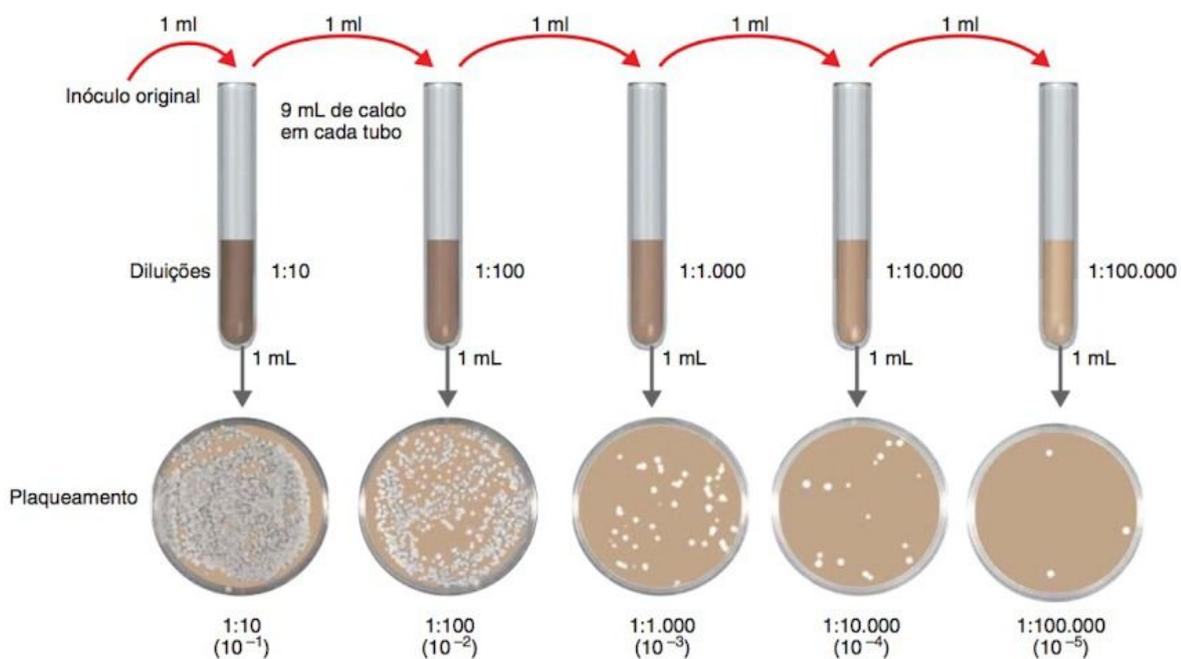
Fonte: www.youtube.com/watch?v=yzZsMSCulrM

O resultado é expresso como número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por ml, de acordo com a seguinte fórmula:

UFC's contadas x denominador da diluição (no *Spread-plate*, multiplicar por **10** o resultado) = UFC/ml

Para as placas em que contou-se 4 quadrinhos, a fórmula é a seguinte:

Média da contagem de UFC's nos 4 quadrados x a área da placa = UFC x denominador da diluição (x10 se *Spread-plate*) = UFC/ml



Fonte: adaptado de Tortora, Microbiologia (2017) - Figura 6.16



Microbiologia Geral
 Universidade Federal do Pampa
 Campus Uruguaiana
 Medicina Veterinária
 Profª Carolina Kist Traesel



ATIVIDADE

Nº		Data	/	/	Turma	
Nome						
Matrícula						
Atividade realizada						

→ Para ajudar você a fixar o conteúdo, foram elaboradas algumas perguntas a respeito desta aula.

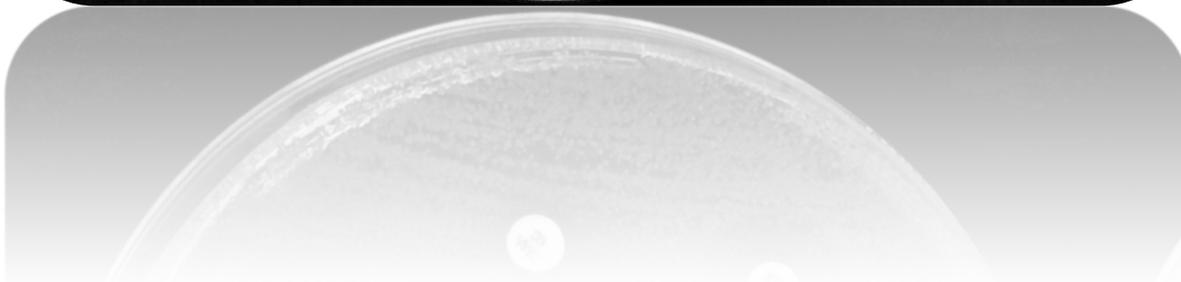
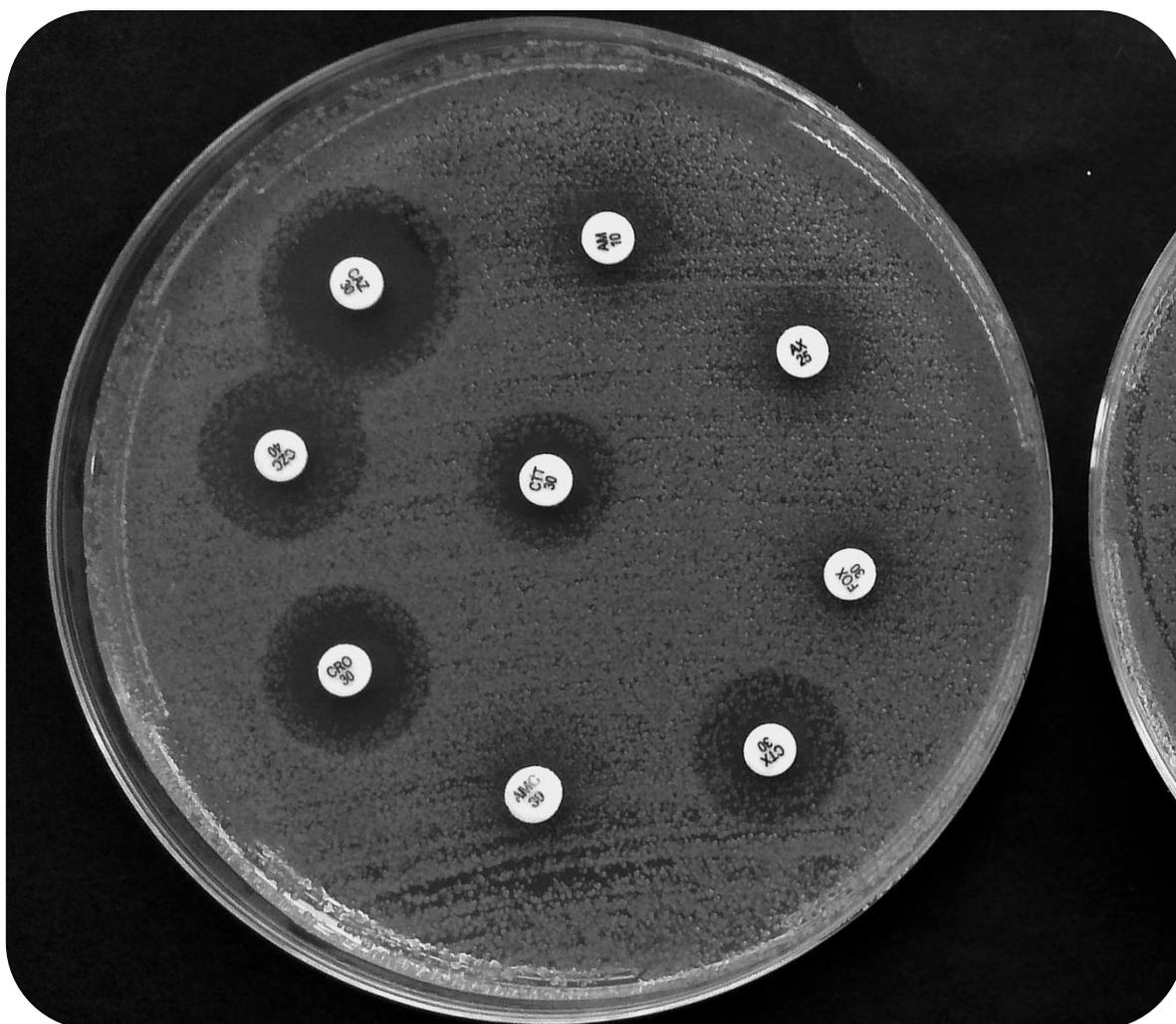
Responda-as e entregue como relatório da aula prática:

1. Cite os três tipos de meio de cultivo utilizados nas técnicas de semeadura em tubo e suas finalidades. Os objetivos de cada técnica de semeadura, assim como o período e a temperatura de incubação, devem estar na resposta também.
2. Explique a diferença dos dois métodos de suspensão em placa para contagem de bactérias: *spread-plate* e *pour-plate*:
3. Por que é importante fazer diluições da amostra para saber o valor da de microrganismos totais?
4. **A)** De acordo com a figura 6.16 na página anterior (Tortora, Microbiologia – 2017), anote o número de UFC's que contou em cada placa e calcule o número de bactérias por ml de suspensão, podendo indicar como incontáveis as diluições nas quais não é possível contar:

Diluição	Nº de colônias	Nº de UFC/ml <i>Pour-plate</i>	Nº de UFC/ml <i>Spread-plate</i>
10 -5			
10 -4			
10 -3			
10 -2			
10 -1			

B) Qual diluição você escolheria para fornecer um resultado de contagem confiável? Por quê?

ANTIBIOGRAMA



ANTIBIOGRAMA

Difusão em Disco | Teste de Kirby & Bauer

O teste de difusão em disco é o mais comumente utilizado nos laboratórios de diagnóstico microbiológico. Este consiste em semear em uma placa de Petri com meio de cultura *Mueller Hinton*, a diluição de um microrganismo puro na escala de *McFarland*, e em seguida inserir os discos de antibióticos. Após incubação, o diâmetro da zona de inibição é usado para determinar se o organismo é sensível, intermediário ou resistente à droga.

Para a aula prática de Microbiologia Geral, onde será realizado o teste de antibiograma por difusão em disco, é necessário ler os seguintes textos:

- Manual Para Antibiograma, Difusão Em Disco, Kirby & Bauer. Trabalho elaborado pela equipe do Setor Técnico da Laborclin destinado à orientação para execução do antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer. **(disponibilizado pela docente)**
- Livro Tortora, capítulo 20: Drogas Antimicrobianas **(disponível na biblioteca do campus)**

Dois textos importantes:

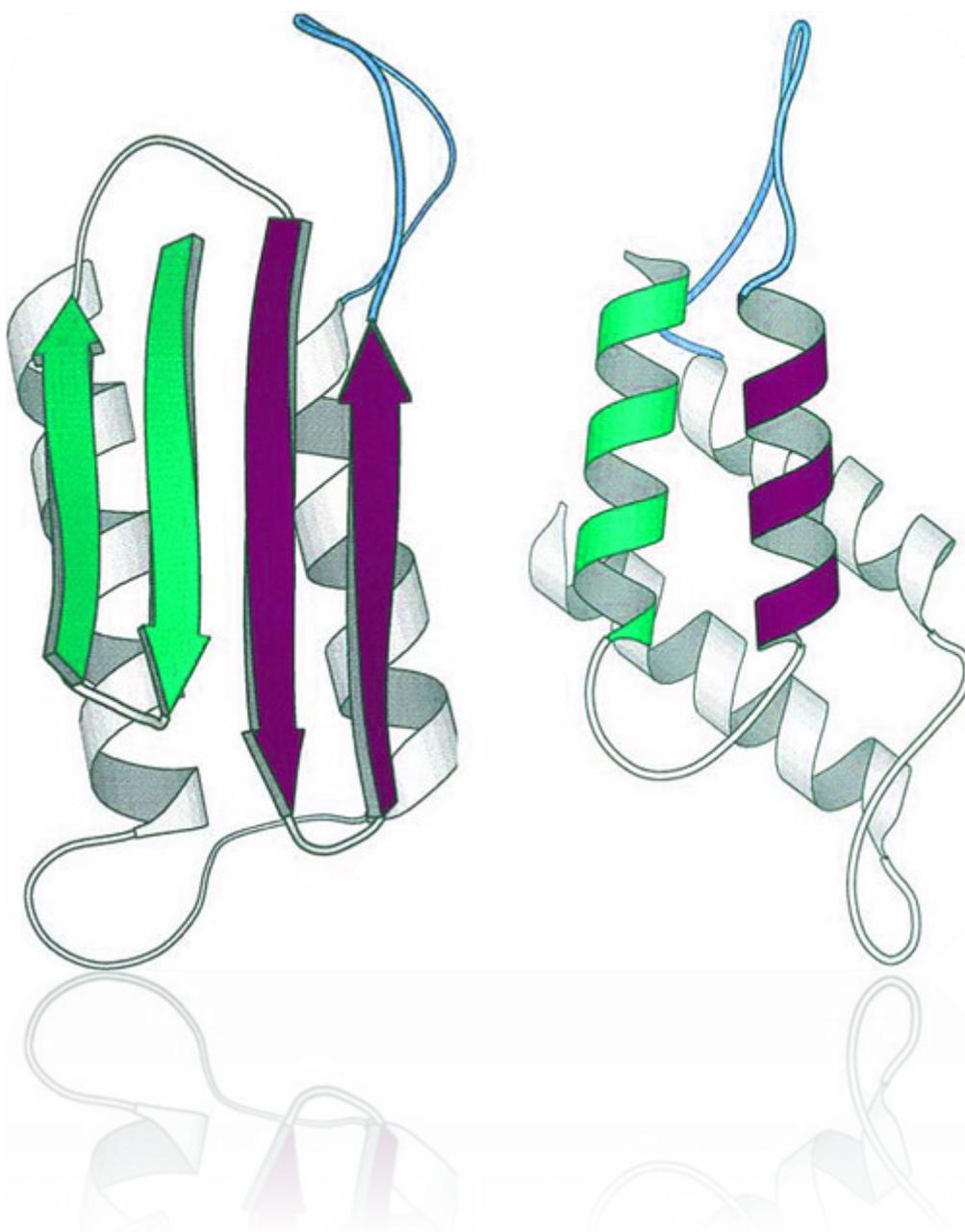
1. Testes Para Orientar a Quimioterapia > Métodos de Difusão
2. Efeitos da Combinação de Drogas

→ Para ajudar você a fixar o conteúdo, foram elaboradas algumas perguntas a respeito desta aula. Responda-as e entregue junto ao relatório da aula prática:

1. O que é e para que serve o antibiograma por difusão em disco?
2. A tetraciclina pode, eventualmente, interferir na atividade da penicilina. Como?

Obs.: No seu relatório, descreva a atividade realizada, o microrganismo e os antibióticos testados e todos os resultados encontrados.

PRÍONS



PRÍONS

BIBLIOGRAFIA DE APOIO

- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- Akikazu Sakudo, et al. "Fundamentals of prions and their inactivation." *International journal of molecular medicine* 27.4 (2011): 483-489. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/ijmm/27/4/483>

→ Para ajudar você a fixar o conteúdo, foram elaboradas algumas perguntas a respeito desta aula. Responda-as e entregue junto ao relatório da aula prática:

1. O que são príons?
2. Como podem ser inativados?
3. Cite duas doenças priônicas de animais. São zoonoses?
4. Todas as doenças causadas por príons possuem em comum uma característica de lesão no sistema nervoso, conhecida como?
5. O que provocou o surto de BSE no Reino Unido na década de 80?

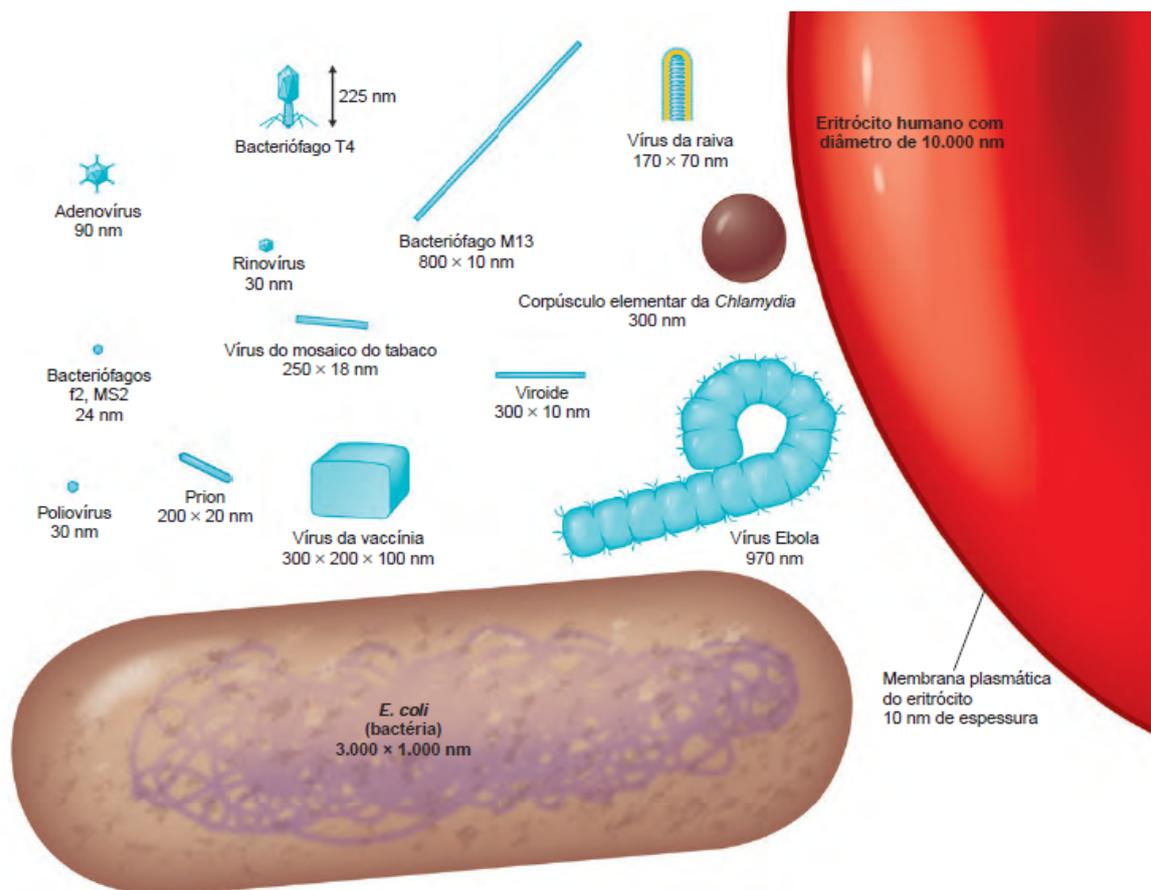
CULTIVO CELULAR



CULTIVO CELULAR

Os vírus são microrganismos menores que as células eucariotas e procariontas e são muito simples. Por não possuírem a maquinaria necessária para a síntese de proteínas e produção de energia metabólica, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios, onde, para realizar a sua replicação, necessitam das funções e do metabolismo celular. Dessa forma, sua atividade biológica só ocorre no interior de células vivas.

Em laboratórios de Virologia ou de Diagnóstico de Doenças Virais, para pesquisar ou identificar a existência de vírus em determinadas amostras, ou para estudar os vírus, é necessário haver cultivo de células vivas. Visto que esses microrganismos são “ativos” e se multiplicam apenas quando dentro de uma célula viva.



Tamanho dos vírus. Os tamanhos de vários vírus (em azul) e bactérias (em marrom) são comparados com um eritrócito humano, representado à direita. As dimensões estão em nanômetros (nm) e representam diâmetro ou comprimento por largura.

Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)



As culturas de células ou cultivos celulares têm substituído o uso de animais ou de ovos embrionados para o cultivo de muitos vírus. Consistem em células que se dividem em meio de cultura em laboratório. É mais

conveniente trabalhar com cultivos celulares, pois, em geral, os cultivos constituem coleções mais homogêneas de células e podem ser propagados e manipulados, (semelhante ao que ocorre com as culturas bacterianas), e não envolvem questões éticas como o uso de animais ou ovos embrionados.

Os cultivos celulares, multiplicam-se sobre um suporte sólido como o fundo de garrafa ou uma placa, formando os tapetes celulares ou monocamadas. Junto a esse suporte, é adicionado o meio de cultura contendo nutrientes essenciais, oxigênio e CO₂ para manutenção da replicação celular.

À medida que as células se dividem, o tapete torna-se mais denso e eventualmente ocupa toda a superfície da garrafa, tornando-se confluyente. Quando essa fase é atingida, as células devem ser subcultivadas para permitir sua multiplicação contínua. Para isso, as células são individualizadas pelo uso da enzima tripsina, ressuspendidas em meio de cultivo e divididas em mais frascos.

Dessa forma, existem tipos de células/cultivo celular usados em laboratórios:

- **Cultivos primários:** Células diplóides, muito sensíveis a infecções com vírus. Incapazes de se multiplicar por muitas passagens (10-20) em cultivos *in vitro*.

A obtenção do cultivo primário é feita a partir de tecido ou órgão, preferencialmente fetal (possui maior atividade mitótica). Esse tecido sofre a ação enzimática da tripsina que irá individualizar as células. Assim, essas são cultivadas em meio de cultura com soro, antibióticos e antifúngicos; mantidas à 37°C, até a formação da monocamada.

Vantagens: São células mais sensíveis do que as células de linhagens.

Desvantagens: É uma técnica trabalhosa, pode haver possibilidade de contaminação por vírus adventícios. Acabam degenerando e morrendo após poucas passagens.

- **Linhas celulares:** Células também diplóides que sofreram modificações em sua carga genética que as torna capazes de atingir até 60-80 subcultivos *in vitro*.

- **Linhagens celulares ou linhas celulares contínuas:** Células heteroplóides, capazes de serem propagadas *in vitro* por um número indefinido de passagens.

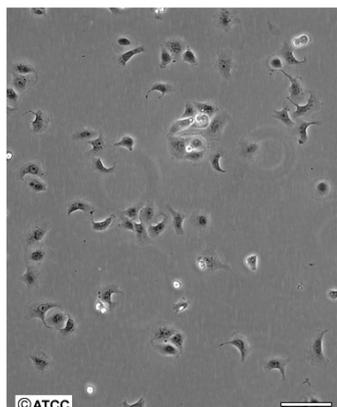
As linhagens celulares, também comumente conhecidas como Cultivo Secundário, já foram em um momento cultivos primários. Entretanto, sofreram mutações consecutivas ao longo do tempo, sendo capazes de multiplicar-se em laboratório por tempo indeterminado, consideradas células imortais.

Vantagens: Obtenção relativamente fácil, população mais selecionada, possuem crescimento rápido, são resistentes e de fácil manipulação.

Desvantagens: Menor sensibilidade ao cultivo de vírus, em relação aos cultivos primários.

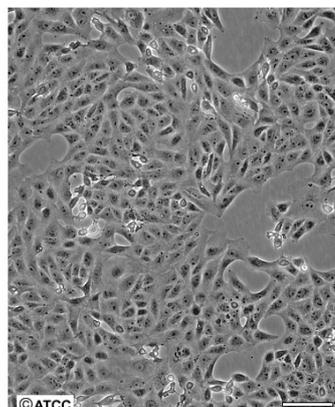


ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



©ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC

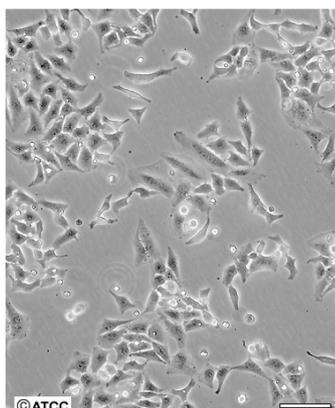
High Density

Scale Bar = 100µm

VERO

A linhagem celular Vero foi iniciada a partir do rim de um macaco verde africano adulto normal em 27 de março de 1962, por Y. Yasumura e Y. Kawakita na Universidade de Chiba em Chiba, Japão.

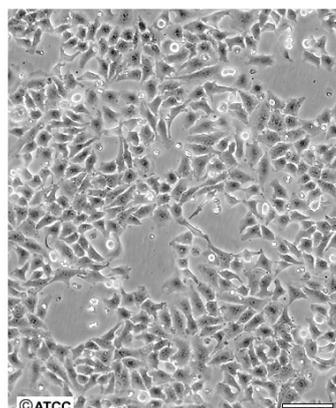
ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



©ATCC

Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC

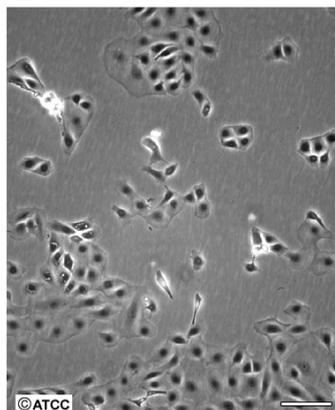
High Density

Scale Bar = 100µm

HeLA

Esta foi a primeira linhagem de células humanas com sucesso *in vitro*, sendo uma grande realização científica em 1951, originou-se de um tumor de **Henrietta Lacks**. Nem ela nem sua família deram permissão médica para colher as células, mas, naquela época, não havia exigências de informar aos seus familiares, sobre esses assuntos, porque o material descartado, ou material obtido durante a cirurgia, era propriedade médica.

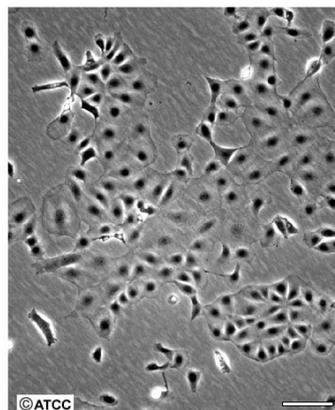
ATCC Number: **CRL-2643**
Designation: **ZFL**



©ATCC

Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

ZFL

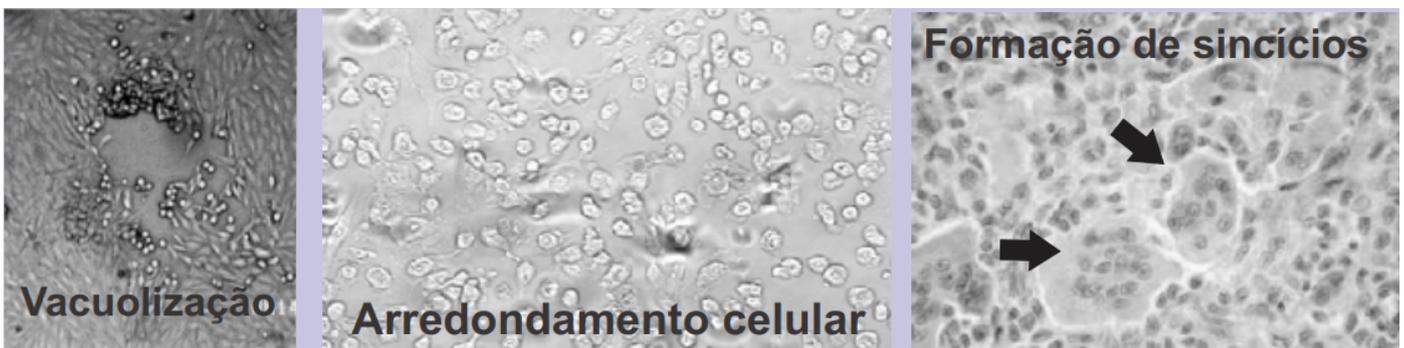
A linha celular ZFL foi estabelecida em 1992 a partir de um conjunto de aproximadamente 10 fígados de peixe-zebra adulto normais. Exibe algumas propriedades características das células do parênquima hepático.

Fonte imagens: www.atcc.org

ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR e EFEITO CITOPÁTICO

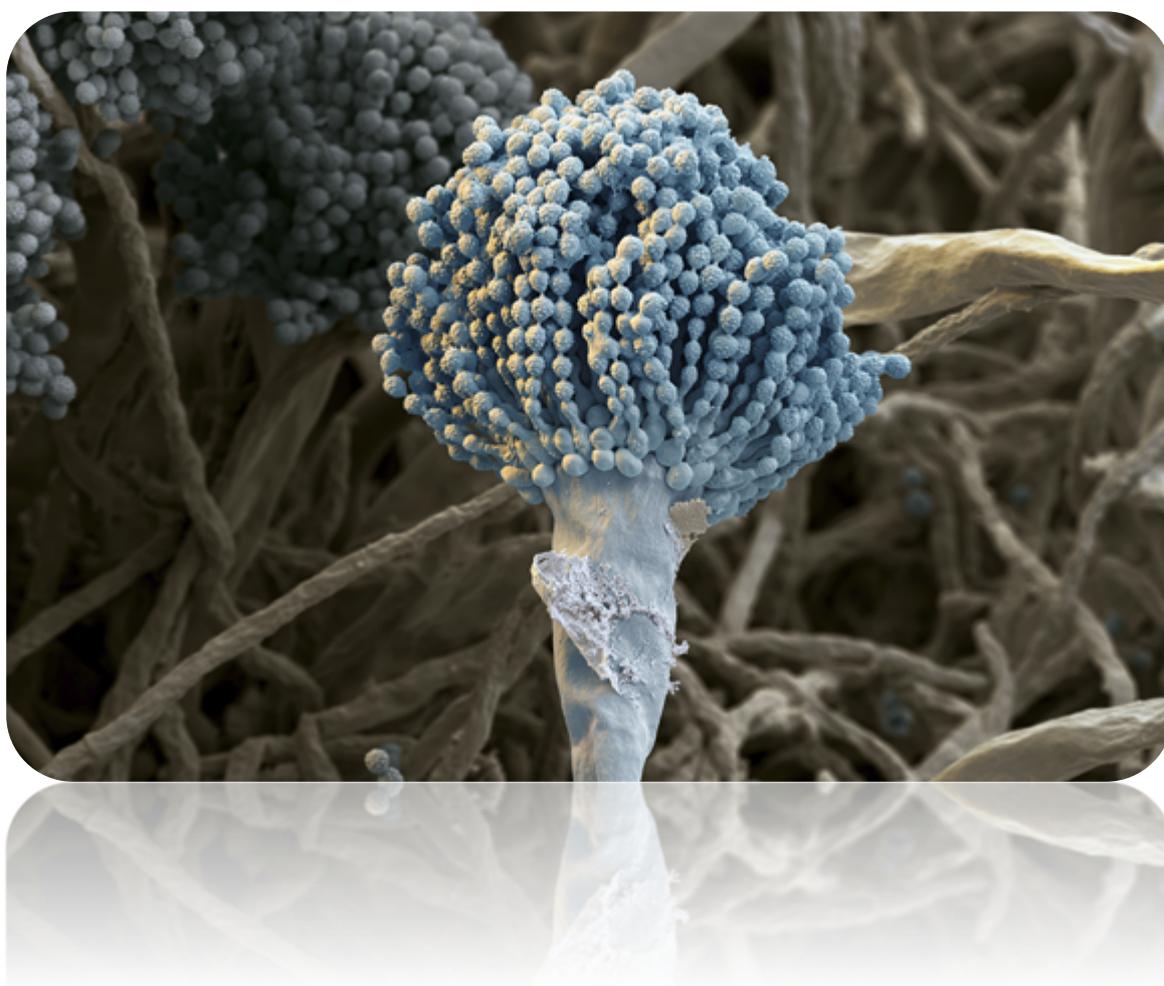
O isolamento em cultivo celular (ICC) é usado na maioria dos vírus de interesse na medicina veterinária e têm boa sensibilidade. De forma simplista, a amostra suspeita de infecção viral é inoculada em células animais cultivadas *in vitro*; após dias/semanas, é possível observar a produção do efeito citopático.

As alterações que ocorrem na célula em cultivo, quando infectadas por algum vírus, são denominadas de Efeito Citopático (ECP). Porém, nem todos os vírus possuem característica de causar efeito citopático em cultivo celular de forma evidente, nesse caso são denominados de não-citopático (NCP). O ECP pode representar um grupo de vírus característicos, ou seja, **pode supor** o grupo viral que causa as alterações celulares. Porém, o ECP não é capaz de identificar o vírus presente na infecção.



Fonte: www.ufrgs.br/labvir/material/Aulapratica1CultivoCelular.pdf

CULTIVO E ISOLAMENTO FÚNGICO



CULTIVO E ISOLAMENTO FÚNGICO

Os fungos são microrganismos eucariotas que compõem o reino *Fungi*. Estes organismos são largamente distribuídos no meio ambiente, com mais de 250.000 espécies, embora menos de 150 são conhecidas como patogênicas para os animais e humanos.

Características gerais dos fungos:

- São eucariotas, ou seja, suas células possuem o material genético envolvido por uma membrana nuclear e por isso estão no domínio *Eukarya*.
- Não fotossintéticos.
- A parede celular possui quitina com ligações cruzadas de celulose
- Na bicamada de membrana celular, o esterol que predomina é o ergosterol, diferente dos animais que predominam o colesterol. O ergosterol é o principal sítio de ação dos antifúngicos.
- São quimio-heterotróficos, precisam de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono. Ainda, a sua nutrição é por absorção (via extracelular) e produzem inúmeras substâncias, dentre elas, enzimas com alto potencial de degradação.
- Podem ser aeróbicos ou anaeróbicos facultativos; somente alguns fungos anaeróbicos são conhecidos.
- Toleram pressão osmótica alta e ph baixo.
- Crescem em meio de cultivo ágar dextrose de ph 5,5.
- A maioria é saprófita; alguns causam infecções oportunistas, principalmente onde há lesões prévias.
- Reproduzem-se **sexuada e assexuadamente** com produção de esporos (diferentes de bactérias que os produzem como mecanismo de defesa, os fungos utilizam os esporos para reprodução)
 - Estão classificados em 3 formas: fungos filamentosos (bolores ou mofos), leveduras unicelulares e fungos dimórficos.

LEVEDURAS

- Crescem em temperatura de 37 graus Celsius (como a temperatura corporal de humanos e alguns animais) A temperatura, assim como a sua morfologia, são vantagens para infecções no organismo animal
- Unicelulares
- Tem forma oval ou esférica (3 a 5 μm de diâmetro)
- No cultivo em *Sabouraud*, parecem-se com colônias bacterianas. As colônias de leveduras são moles, lisas e redondas.
- Na coloração de GRAM, são vistas como células maiores que bactérias em forma de cocos e de cor roxa (GRAM +)
- Na maioria das leveduras, a divisão assexuada dá-se por brotamento. As células filhas separam-se da célula de origem após a formação de um septo no ponto de brotamento



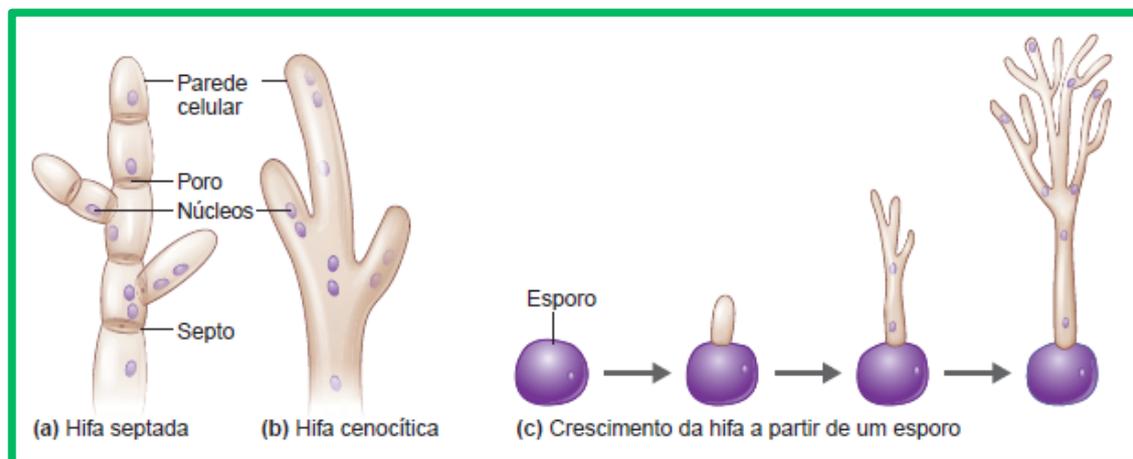
Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)

- Exemplos: *Candida* e *Criptococcus*

FILAMENTOSOS

- Crescem em temperatura de 25 graus Celsius (temperatura ambiente)
- Multicelulares
- Crescem como filamentos ramificados denominados de hifas (2 a 10 μm de diâmetro)
- Fazem autofagia
- Crescem de forma radial
- Reprodução:

Os esporos fúngicos transportados pelo ar germinam em locais nos quais as condições ambientais são favoráveis. Os esporos incham e sua atividade metabólica aumenta antes da produção de projeções tubulares que os transformam em hifas. As hifas podem ser septadas, onde septos as dividem em unidades tipo célula; ou podem ser hifas cenocíticas, onde não há septos. O crescimento das hifas dá-se por prolongamento das extremidades. Um conjunto de hifas se denomina de micélio.



Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)

- Os esporos produzidos na **reprodução assexuada** são de dois tipos: conídios e esporangiósporos. Os conídios são formados nos conidióforos, e os esporangiósporos são formados dentro do esporângio (estrutura semelhante a um saco que sustenta uma hifa aérea chamada esporangióforo).

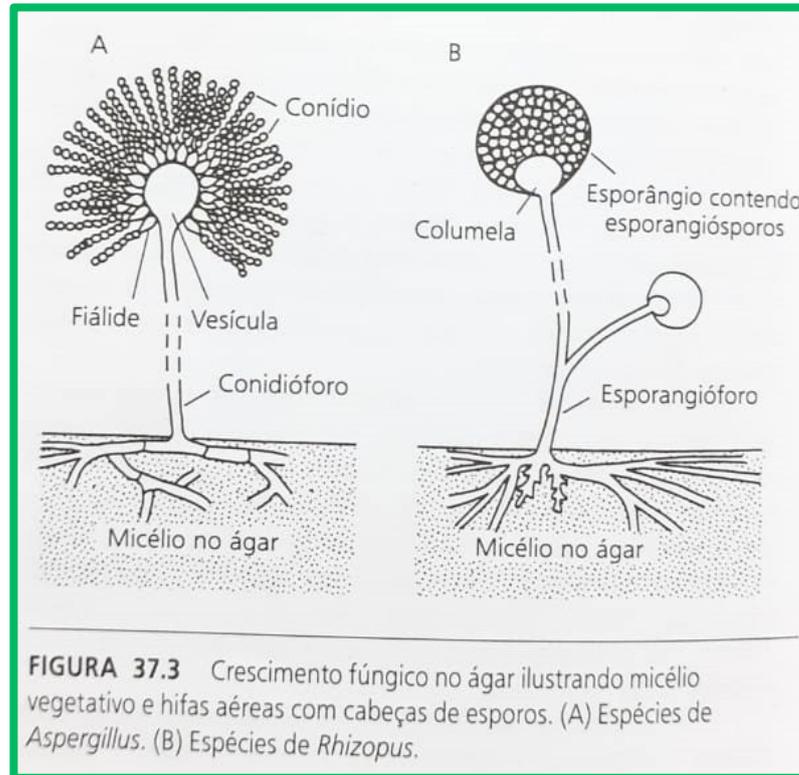
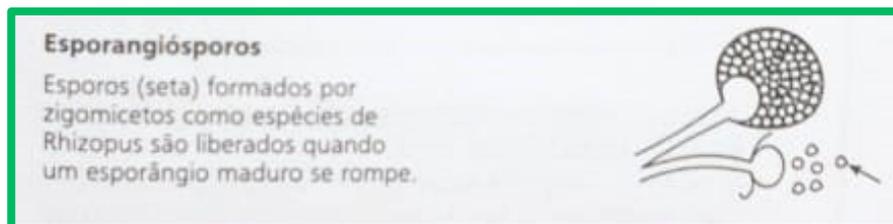


FIGURA 37.3 Crescimento fúngico no ágar ilustrando micélio vegetativo e hifas aéreas com cabeças de esporos. (A) Espécies de *Aspergillus*. (B) Espécies de *Rhizopus*.

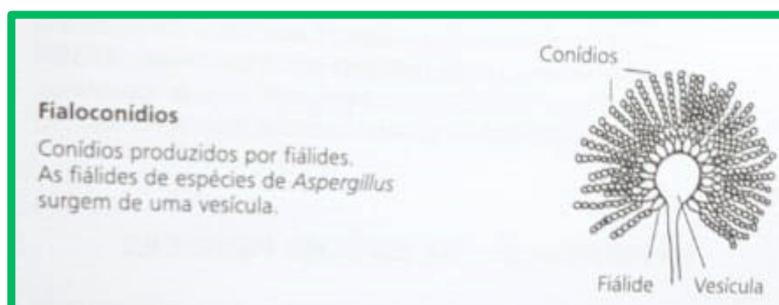
Fonte: Quinn, P. J. (2005)

- Esporangiósporos são formados somente pelos fungos do filo *Zygomycota* onde as hifas são não-septadas



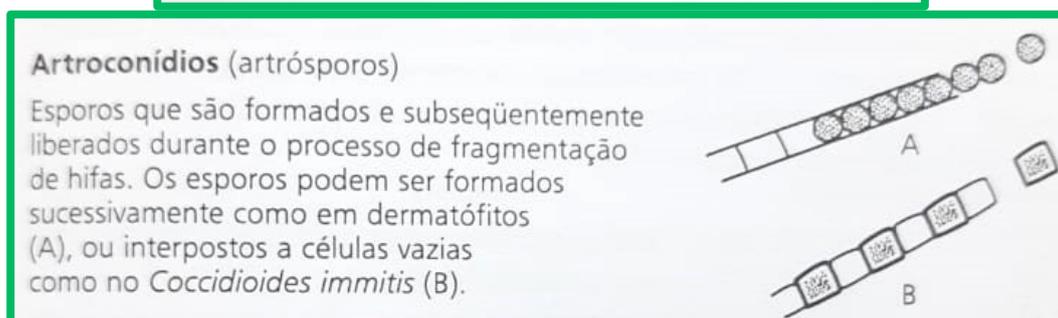
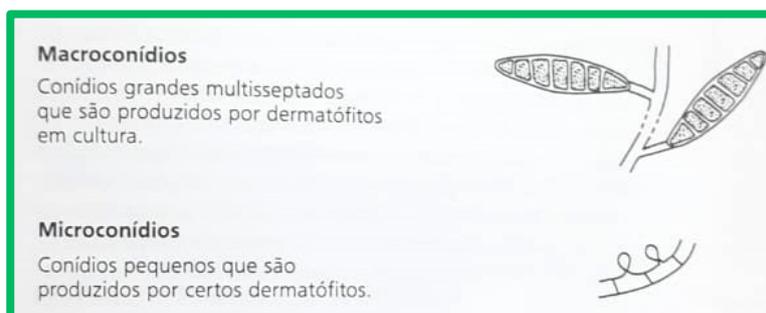
Fonte: Quinn, P. J. (2005)

- Conidióforos são formados nos fungos dos outros filis (*Ascomycota*, *Basidiomycota* e em fungos imperfeitos [deuteromicetos]) e as hifas são septadas



Fonte: Quinn, P. J. (2005)

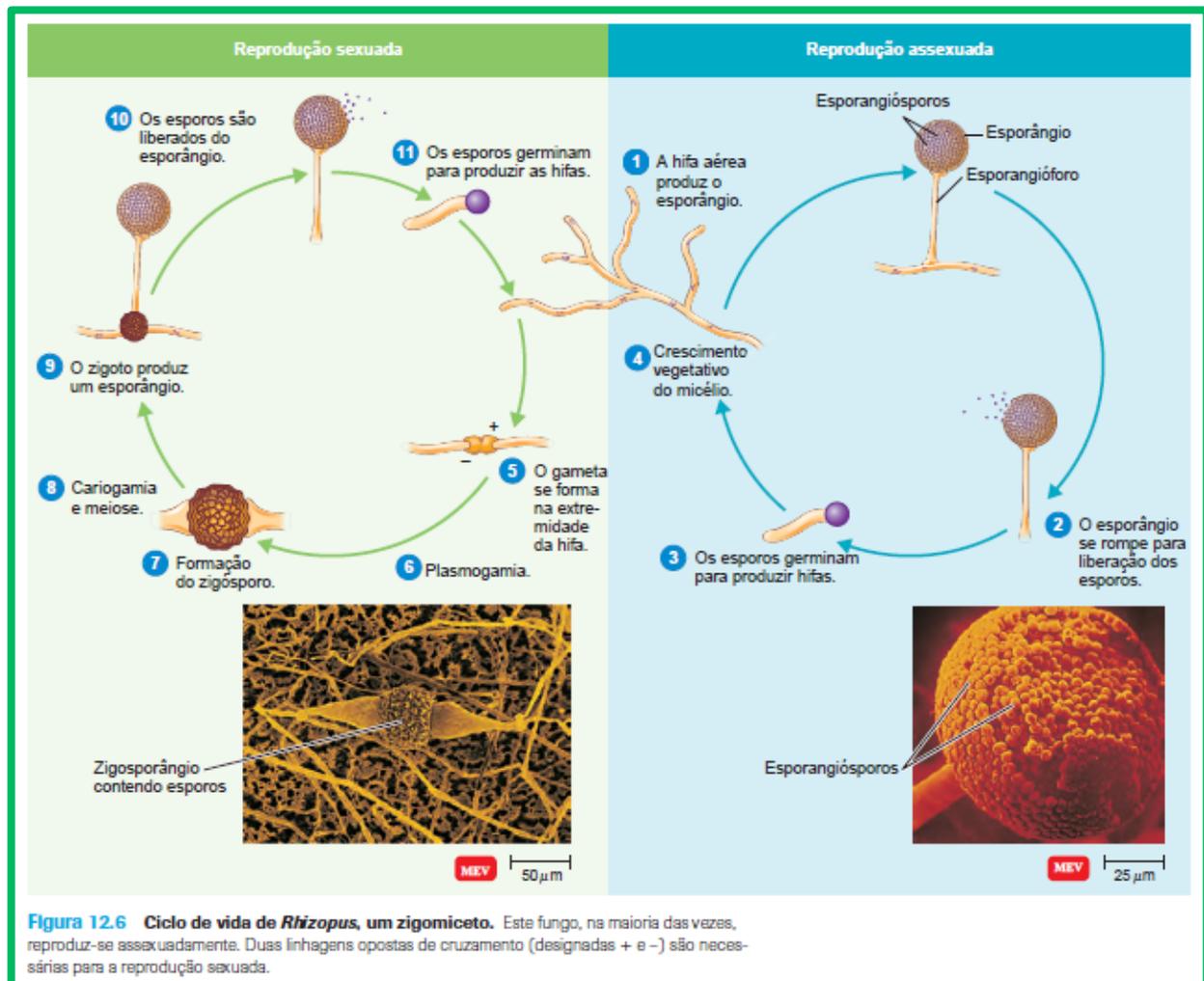
○ Nos dermatófitos, estruturas multicelulares chamadas macroconídios e estruturas únicas chamadas microconídios são formadas em culturas nas ramificações laterais de hifas, enquanto artroconídios são formados a partir da desintegração de hifas dentro de estruturas queratinizadas.



Fonte: Quinn, P. J. (2005)

- **Reprodução sexuada**

- Um esporo sexual fúngico resulta da reprodução sexuada, consistindo de três etapas:
 1. **Plasmogamia.** Um núcleo haploide de uma célula doadora (+) penetra no citoplasma da célula receptora (-).
 2. **Cariogamia.** Os núcleos (+) e (-) se fundem para formar um núcleo zigoto diploide.
 3. **Meiose.** O núcleo diploide origina um núcleo haploide, esporos sexuais, dos quais alguns podem ser recombinantes genéticos.



Fonte: Tortora, Microbiologia. (2010)

- **Inoculação de fungos**
 - Repique realizado com palito, pois são muito aderidos ao meio de cultivo.
 - Tanto para amostras quanto para repasses de fungos já em placas, deve-se depositar o conteúdo no centro da placa, devido ao tipo de crescimento radial.
 - Nutrição para o crescimento: tempo, temperatura, O₂, CO₂, umidade e ph.

- Características para diferenciação de fungos:

Características	Filos			Fungos imperfeitos
	<i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Deuteromycota</i>
Esporos sexuais	Ascósporos	Basidiósporos	Zigósporos	Desconhecido
Esporos assexuais	Conídios	Conídios	Esporangiósporos	Conídios
Hifas septadas	+	+	-	+
Exemplos	<i>Candida</i> <i>Malassezia</i> Dermatófitos <i>Aspergillus</i> <i>Histoplasma</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Rhizopus</i> <i>Mortierella</i> <i>Absidia</i> <i>Mucor</i>	

Fonte: Adaptado. Quinn, P. J. (2005)

DIMÓRFICOS

- Crescem filamentosos em temperatura de 25 graus
- Crescem leveduriformes em temperatura de 37 graus
- Exemplos: *Histoplasma*, *Sporotrix*, *Blastomyces*

Importância dos fungos

Os fungos também são benéficos, sendo importantes na cadeia alimentar por decomporem matéria vegetal morta, reciclando elementos vitais. Pelo uso de enzimas extracelulares como as celulases, os fungos são os principais decompositores de partes duras das plantas, que não podem ser digeridas pelos animais. Quase todas as plantas dependem de simbioses com fungos, conhecidas como micorrizas, que auxiliam as raízes das plantas a absorverem minerais e água do solo. Os fungos também são valiosos para os animais. Algumas formigas cultivam fungos para quebrar a celulose e a lignina presentes nas plantas, provendo glicose, que as formigas podem então digerir. Os fungos são utilizados pelos homens como alimentos (cogumelos) e também para a produção de alimentos (pão e ácido cítrico) e drogas (álcool e penicilina).



ATIVIDADE

Nº		Data	/	/	Turma	
Nome						
Matrícula						
Atividade realizada						

→ Para ajudar você a fixar o conteúdo, foram elaboradas algumas perguntas a respeito desta aula. Responda-as e entregue junto ao relatório da aula prática:

- No Reino *Fungi*, é possível encontrar representantes multicelulares e unicelulares. Entre os organismos indicados a seguir, marque a alternativa que apresenta um exemplo de fungo unicelular.
 - Cogumelo
 - Levedura
 - Bolor
- (Cesgranrio-RJ). Assinale a opção que apresenta uma característica ausente no reino *Fungi*.
 - Reprodução assexuada.
 - Respiração anaeróbia.
 - Célula procariótica.
 - Nutrição heterotrófica.
 - Relação mutualística.
- (PUC-RIO). Os fungos são organismos que:
 - Realizam a reserva de carboidratos na forma de amido.
 - Sempre apresentam o corpo constituído por uma célula (unicelulares), geralmente filamentosa, exceto as estruturas reprodutivas.
 - São procariontes que geralmente formam colônias.
 - Desempenham um papel muito importante na nutrição vegetal, através das associações simbióticas com as raízes das plantas, sendo chamados micorrizas.
 - São autotróficos ou heterotróficos.

4. Os fungos apresentam um importante papel para o meio ambiente, sendo, junto com as bactérias, fundamentais para o processo de
- Endossimbiose
 - Metamorfose
 - Decomposição
 - Fotossíntese
 - Respiração celular
5. Complete:
- Os fungos dimórficos crescem como _____ quando cultivados em ágar dextrose _____ a ___ °C e como _____ quando cultivados em meios enriquecidos a ___ °C.
6. A membrana celular dos fungos difere da célula animal por ter _____ como principal componente esteroide, onde, esse é o alvo primário de muitos agentes terapêuticos antifúngicos.
7. De acordo com as imagens, classifique o tipo de fungo cultivado (bolor ou levedura) e cite uma característica do mesmo:





BIBLIOGRAFIA

- FLORES, E. F. **Diagnóstico laboratorial de infecções víricas**. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 295-326.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Cell Culture Basics. Ivitrogen. Disponível em:
<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>
- Cultivo Celular. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf
- Cultivo Celular, Ufgrs. Disponível em:
<http://www.ufrgs.br/labvir/material/Aulapratica1CultivoCelular.pdf>
- Demonstração de efeito citopático induzido por alguns vírus em células cultivadas "in vitro" e de corpúsculos de inclusão em tecido infectado. Disponível em:
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4381128/mod_resource/content/1/Efeito%20citop%C3%A1tico.pdf
- QUINN, P. J. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

IMAGENS DAS CAPAS

- **CAPA**. Adaptado. Disponível em: br.freepik.com/vetores-premium/bacterias-patogenicas-celulas-virus-ou-perigosas_3916273.htm
- **COLETA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS**. Disponível em: br.freepik.com/vetores-premium/bacterias-patogenicas-celulas-virus-ou-perigosas_3916273.htm
- **TÉCNICAS DE COLORAÇÃO NA BACTERIOLOGIA; COLORAÇÃO DE GRAM**. Disponível em: br.freepik.com/vetores-gratis/conjunto-de-icone-de-bacterias_4665731.htm
- **TÉCNICAS DE SEMEADURA; SPREAD-PLATE; CONTAGEM EM PLACA**. Adaptado. Disponível em: br.freepik.com/fotos-premium/staphylococcus-aureus-e-streptococcus-pyogenes_2155832.htm
- **ANTIBIOGRAMA**. Adaptado. Disponível em: www.researchgate.net/post/Does_anyone_know_about_antibiotic_disk_diffusion_method
- **PRÍONS**. Adaptado. Disponível em: www.flickr.com/photos/ajc1/464066753
- **CULTIVO CELULAR**. Adaptado. Disponível em: www.drugdiscoverytrends.com/avoiding-contamination-in-cell-cultures/
- **CULTIVO E ISOLAMENTO FÚNGICO**. Adaptado. Disponível em: www.sciencephoto.com/media/1020926/view



Universidade Federal do Pampa