



Normas Adotadas no Laboratório de Microbiologia

As aulas práticas de microbiologia têm como objetivo ensinar ao estudante os princípios e os métodos utilizados em um laboratório de microbiologia.

Nessas aulas trabalharemos com uma variedade de bactérias, algumas patogênicas para o homem. Portanto, é essencial seguir as normas de segurança estabelecidas para um laboratório de microbiologia, a fim de se evitar contaminação dos estudantes, professores e funcionários.

- 1 - Desinfetar a bancada de trabalho no início e término de cada aula prática.

Para essa finalidade, utiliza-se álcool comercial. Com este procedimento, os microrganismos que poderiam contaminar as culturas na área de trabalho são removidos.

- 2 - Não comer ou fumar no laboratório.

Se a bancada, equipamentos ou instrumentos tiverem sido contaminados acidentalmente com qualquer microrganismo, comer ou fumar é meio eficiente para uma auto contaminação.

- 3 - Usar sempre avental.

Não utilizá-lo fora do laboratório, caso tenha sido contaminado acidentalmente.

- 4 - Lavar as mãos ao sair do laboratório e sempre que suspeitar de contaminação.

- 5 - Avisar ao professor em caso de contaminação acidental.

- 6 - Não colocar materiais contaminados (pipetas, lâminas etc.) sobre a bancada.

Estes materiais devem ser colocados em recipientes apropriados que serão dispostos em cada bancada.

- 7 - Cada aluno é responsável pelo material que receber.
- 8 - Seguir as normas de uso dos aparelhos. O microscópio é um instrumento de trabalho valioso e deve ser manipulado cuidadosamente. São tidos como pré-requisitos conhecimentos sobre microscópios ópticos comuns.
- 9 - Cuidado ao acender o bico de gás (bico de Bunsen). Verificar se não existem substâncias inflamáveis por perto.
- 10 - Flambar alças, agulhas e pinças antes e após o uso.

Conteúdo

1. Limpeza, montagem e esterilização de material usado em Microbiologia.....	3
Limpeza e Montagem.....	3
Esterilização.....	3
2. Técnicas assépticas e semeadura de microrganismos.....	4
3. Preparação, acondicionamento e controle de qualidade de meios de cultura.	5
4. Técnica de inoculação de bactérias em meio de cultura e verificação de crescimento	6
5. Morfologia bacteriana (celular e da colônia) e coloração de Gram.....	7
Morfologia.....	7
Tamanho:	7
Forma:	7
Arranjo:	8
Estudo morfológico de colônias bacterianas	8
6. Crescimento em Meios Seletivo e Diferencial	10
MEIOS SELETIVOS:.....	10
MEIO DIFERENCIAL:.....	10
MEIO SELETIVO E DIFERENCIAL:.....	10
Bibliografias online [Links]	11

1. Limpeza, montagem e esterilização de material usado em Microbiologia

Após ter estudado esta unidade e ter preparado o experimento prático, você estará apto a:

Limpeza e Montagem

Objetivos

- Caracterizar a estrutura e o funcionamento de um laboratório de Microbiologia
- Executar técnicas de preparo e montagem de matéria para esterilização.

Introdução

um laboratório de Microbiologia destina-se ao estudo de microrganismos, compreendendo entre outras atividades, seu isolamento, identificação, caracterização, quantificação e conservação. A este estudo aplicam-se "técnicas microbiológicas", que envolvem uma série de operações e normas padronizadas, instalações e instrumental próprios.

No estudo de microrganismos são imprescindíveis as seguintes operações: execução de preparações microscópicas, esterilização de vidrarias, preparo de meios de cultura e materiais diversos, técnicas de cultivo, isolamento e outros ensaios microbiológicos.

Esterilização

Objetivos

- Caracterizar os diversos métodos de esterilização.
- Executar O processo de esterilização em calor umido e conhecer outros metodos.

Introdução

Vários procedimentos de esterilização são usados para destruir microorganismos. A escolha do método depende principalmente de natureza do material a ser esterilizado.

O objetivo da esterilização é destruir ou remover todos os organismos patogênicos ou não, incluindo os esporos bacterianos. Não existe a expressão meio termo como "quase estéril", o termo estéril ou esterilização não deve ser usado com sentido relativo.

As bactérias nas suas formas vegetativas, são destruídas com certa facilidade pelos métodos comuns de esterilização. O mesmo comportamento observado para as células vegetativas e esporos de leveduras e bolores esporos bacterianos, no entanto, constituem um grupo de organismos apresentam a maior resistência a ação dos agentes físicos, especialmente a temperatura. A maioria dos esporos bacterianos exige, para a sua eliminação temperaturas superiores a 100°C por período de tempo prolongado. A relação temperatura e tempo de exposição que deve ser usada para tornar material estéril é baseada no grau de resistência ao calor dos esporos bacterianos.

2. Técnicas assépticas e semeadura de microrganismos

Objetivos

- Treinar o aluno na manipulação de meios e culturas em condições de assepsia;
- Executar técnicas de semeadura de microrganismos em meios sólidos e líquidos.

Introdução

O isolamento, cultivo e identificação de microrganismos requerem técnicas adequadas de inoculação destes microrganismos em meios de cultura que possibilitem o seu rápido crescimento, livre de contaminações. Estas são as chamadas "técnicas assépticas". Para sua execução, certas precauções especiais devem ser

observadas pelo manipulador na ocasião da prática de técnicas de semeadura, com o fim de preservar a pureza do cultivo e minimizar os riscos de infecção ou intoxicação no laboratório. Assim, o estabelecimento de uma zona de esterilidade é garantida pela regulação do bico de gás (Bunsen). É somente nesta zona, estéril, que os tubos ou recipientes com meios de cultura, estéreis ou com material a ser inoculado, deverão ser abertos ou manipulados. Qualquer outro material deverá ser mantido nesta área, para ser preservada a sua esterilidade. As manipulações deve ser feitas, preferencialmente, por trás da chama do bico de gás. As alças ou agulhas, de platina ou níquel-cromo, devem ser flambadas imediatamente antes e depois de qualquer transferência. Elas devem ser flambadas em todo seu comprimento, a partir de alguns centímetros do cabo de Kolle, até ao rubro, mantendo-as em posição vertical à chama do bico de Bunsen. Nunca iniciar a flambagem pela extremidade livre da alça ou agulha. Deixar esfriar nas proximidades da chama.

3. Preparação, acondicionamento e controle de qualidade de meios de cultura.

Objetivos

- Realizar a preparação de meios de cultura.
- Realizar a armazenagem correta dos meios de cultura.
- Descrever os fatores que podem interferir na preparação dos meios que influenciam um resultado satisfatório de crescimento bacteriano.
- Efetuar as normas que regem o controle de qualidade dos meios de cultura.

Introdução

Os meios de cultura destinam-se ao cultivo artificial dos microrganismos. Estes meios fornecem os princípios nutritivos indispensáveis ao seu crescimento. As exigências nutritivas estão relacionadas a uma fonte de carbono, de nitrogênio, de energia e de sais minerais. Alguns microrganismos também necessitam de fatores de crescimento que são substâncias que eles não podem sintetizar, tais como vitaminas, aminoácidos etc.

Outras condições inerentes ao meio de cultura necessário ao desenvolvimento são as condições de pH, pressão osmótica e grau de umidade.

4. Técnica de inoculação de bactérias em meio de cultura e verificação de crescimento

Objetivos

- Realizar inoculação em meio de cultura líquido e sólido.
- Verificar a presença ou ausência de crescimento bacteriano nos meios inoculados.
- Definir e descrever as características morfológicas de uma colônia.
- Definir cultura pura e mista.

Introdução

Os microrganismos necessitam de um meio de cultura adequado para seu crescimento *in vitro*. Mas, além dos componentes presentes no meio, outros fatores interferem no seu desenvolvimento: são fatores ambientais como temperaturas (psicrófilas, mesófilas e termófilas) e tensão de oxigênio (aeróbias, anaeróbias, microaerófilas e anaeróbias facultativas).

Inoculando um microrganismo em um meio de cultura que possua todos estes requisitos nutritivos e fatores ambientais favorecidos, o microrganismo inicia seu desenvolvimento neste meio, passando pelas diversas fases da *curva de crescimento*, desde a fase de latência, logarítmica, estacionária, até a fase da morte.

A fase logarítmica (exponencial) é caracterizada por divisões sucessivas (cissiparidade), originando a formação de um grupamento de bactérias da mesma espécie, que é denominado *colônia*. Esta é visualizada sem o auxílio do microscópio, sendo então considerada como característica macroscópica das bactérias.

5. Morfologia bacteriana (celular e da colônia) e coloração de Gram

Objetivos

- Executar a técnica de coloração de Gram.
- Relacionar a composição química da parede celular das bactérias com os corantes de Gram.
- Classificar as bactérias de acordo com a coloração de Gram.
- Verificar a importância de realizar a coloração de Gram a partir de um material clínico.
- Citar as formas das bactérias.
- Descrever seus arranjos.

Introdução

Morfologia

As células bacterianas são caracterizadas morfológicamente quanto aos seguintes aspectos:

Tamanho:

As bactérias são microscópicas, medindo desde 0,3 por 0,8µm até 10 por 25µm. As espécies de maior interesse médico medem entre 0,5 a 1µm por 2 a 5µm. Sendo assim, não conseguimos visualizá-las a olho nu, precisando do uso de microscópio óptico comum. A aplicação de aumento maior (microscópio eletrônico) só é útil no estudo das estruturas bacterianas.

Forma:

As bactérias podem ser classificadas quanto à forma em três grupos básicos:

1. *Cocos* - células esféricas;
2. *Bacilos* - células cilíndricas, em forma de bastonetes;
3. *Espirilos* - células espiraladas.
4. Algumas células se comportam como bacilos curvos que podem ser denominados *víbrios*.

Entre as bactérias espiraladas existem as *espiroquetas*, que são células flexíveis que se movimentam por rotação e flexão.

Arranjo:

1. Diplococos
2. Estreptococos
3. Estafilococos
4. Tétrades

Entre outros.

Em todos esses procedimentos práticos de laboratório de microbiologia é necessário ter uma sequência.


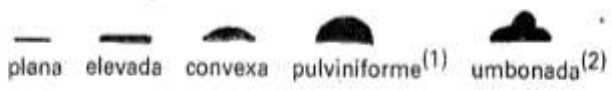

O tempo de geração de uma bactéria é de 20 minutos. Por esse motivo é necessário que haja disponibilidade do laboratório todos os dias, para que os alunos possam acompanhar todo o crescimento do microrganismo em estudo. E assim, conseguir os meus objetivos pedagógicos.

Estudo morfológico de colônias bacterianas**Inoculo:**

(Descrever o meio e em que condições o microrganismo em estudo foi inoculado e incubado).

Avaliação das culturas

(Avaliar as formas morfológicas das colônias cultivadas em placa de Petri).

<p><u>Tamanho</u></p> <p>Colônia: pequena, media ou grande</p>	
<p><u>Forma</u></p>  <p>puntiforme circular filamentososa irregular rizóide fusiforme</p>	
<p><u>Elevação</u></p>  <p>plana elevada convexa pulviniforme⁽¹⁾ umbonada⁽²⁾</p>	
<p><u>Bordos</u></p>  <p>inteiro ondulado lobado denteado-irregular filamentososo</p> <p>encrespado</p>	
<p><u>Cromogênese</u></p> <p>Pigmentada ou sem pigmento (cor: amarela, preta, vermelha, etc.)</p>	
<p><u>Detalhe óptico</u></p> <p>(transparente, translúcida, opaca ou brilhante)</p>	
<p><u>Superfície</u></p> <p>(lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta).</p>	

6. Crescimento em Meios Seletivo e Diferencial

Objetivo:

- Conhecer e discutir a aplicação dos diversos tipos de meios de cultura.
- Identificar se o experimento se apresenta como Meio seletivo e/ou diferencial.

Introdução:

Entre os principais componentes de um meio de cultura estão as fontes de carbono e energia como os açúcares, as fontes de nitrogênio, fósforo e sais minerais. Outros componentes mais específicos podem ser encontrados em um meio específico para um determinado organismo (meio seletivo), estes são os **Fatores de Crescimento** como as vitaminas, aminoácidos, etc. No entanto podemos ter em um meio constituintes que inibam o crescimento de determinados microrganismos, sendo estes também considerados meios seletivos. Além de meios seletivos existem também meios que permitem diferenciar microrganismos, o exemplo mais simples é a existência de um indicador de pH que permite verificar se, por exemplo, um açúcar presente no meio é metabolizado pois, ao ser, implica a produção de metabolitos que acidificam o meio alterando o seu pH e consequentemente a alteram a cor do indicador de pH.

MEIOS SELETIVOS:

São elaborados com o objetivo de favorecer o crescimento da bactéria de interesse impedindo o crescimento de outras bactérias. Exemplos: Manitol e MacConkey

MEIO DIFERENCIAL:

Permite a diferenciação de organismos que cresce no meio, facilita a identificação da bactéria de interesse quando existem outras bactérias crescendo na mesma placa do meio de cultura.

MEIO SELETIVO E DIFERENCIAL:

Podem esta combinadas as duas características no mesmo meio, são utilizados para a fácil identificação da colônia da bactéria de interesse. MacConkey: contém sais biliares e cristal violeta que são inibidores do crescimento de bactérias Gram-positivas. Contém também lactose que permite diferenciar bactérias

fermentadoras gram-negativas capazes utilizar lactose (colônias vermelhas ou rosas) daquelas que não a utilizam (colônias incolores)

Bibliografias online [Links]

- Disponível em: <http://microbiologiabrasil.blogspot.com/2009/01/tcnicas-utilizadas-para-identificar-e.html> acessado em 04 de ago 2009
- Disponível em:
<http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/MEIOS%20DE%20CULTURA.doc>
acessado em 04 de ago de 2009.