



**UNIVERSIDADE  
DE ÉVORA**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

MICROBIOLOGIA  
MICROBIOLOGIA GERAL  
PRINCÍPIOS DE MICROBIOLOGIA

Textos de apoio e Manual prático

Carlos Sinogas, Luís Alho, Isabel Brito

2002 / 2003

## ÍNDICE

Comportamentos em laboratório de microbiologia.....	3
Nível de segurança 1 .....	3
Regras.....	3
Procedimentos gerais.....	5
Registos e relatórios.....	6
Técnicas laboratoriais básicas em microbiologia.....	7
Meios de cultura.....	7
Esterilização .....	8
Tubos de cultura e placas de Petri.....	8
Instrumentos para transferência de culturas.....	8
Câmaras de cultura .....	9
Frigorífico .....	9
Métodos de esterilização .....	10
Esterilização pelo calor .....	10
O Microscópio.....	13
Componentes principais do microscópio .....	13
Princípios teóricos .....	14
Observação ao Microscópio.....	15
Morfologia das bactérias.....	16
Corantes .....	16
Meios de cultura .....	18
Tipos de meio.....	18
Preparação .....	19
Contagens de microorganismos.....	20
Avaliação directa.....	20
Contagem de viáveis.....	20
Isolamento de colónias em meio sólido.....	22
Sementeira por espalhamento .....	22
Sementeira por riscado .....	22
Condições ambientais de crescimento dos microorganismos .....	24
Oxigénio .....	24
pH.....	25
Temperatura .....	25
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	27
P1 - MICROORGANISMOS NO MEIO AMBIENTE .....	27
P2 - OBSERVAÇÃO COMPARADA DE BACTÉRIAS, FUNGOS E PROTOZOÁRIOS.....	30
P3 - MEIOS DE CULTURA.....	33
P4 - CULTURAS PURAS.....	35
P5 - COLORAÇÃO DE BACTÉRIAS. MORFOLOGIA E ASSOCIAÇÃO .....	37
P6 - QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS.....	40
P7 - CADEIA DE TRANSMISSÃO.....	42
P8 - TESTE DO PAPEL HIGIÉNICO .....	44
P9 - CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CRESCIMENTO MICROBIANO .....	46
P10 - ANTIBIÓTICOS.....	49
P11 - ANTI-SÉPTICOS E DESINFECTANTES .....	51
P12 - MICROBIOLOGIA DAS ÁGUAS.....	53
P13 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE.....	56
P14 - PREPARAÇÃO DE UM IOGURTE .....	60
P15 - ISOLAMENTO DE RHIZOBIUM. Observação de nódulos e bacteroides.....	62
P16 - BACTERIÓFAGO DE E. COLI .....	71

## **COMPORTAMENTOS EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA**

Os laboratórios de Microbiologia são locais especiais, ambientes por vezes únicos, capazes de promover a disseminação de agentes causadores de doenças infecciosas nas pessoas que neles trabalham ou com quem estas contactam.

Qualquer microorganismo, por mais inócuo que seja, interage com o meio e com as outras formas de vida que o envolvem. Porque esta interacção pode ser indesejável ou mesmo perigosa, há que observar algumas regras durante as operações laboratoriais com microorganismos.

As regras e comportamentos que se determinam pretendem também contribuir para evitar a propagação de contaminações cruzadas, susceptíveis de perturbar o sucesso das experiências laboratoriais dos próprios e de terceiros.

### **NÍVEL DE SEGURANÇA 1**

O nível do risco associado ao contacto dependerá do microorganismo propriamente dito, seu tipo, forma e quantidades, das formas de vida e do tipo de contacto que é estabelecido e da duração desse contacto.

Tendo em conta principalmente a segurança dos operadores, consideram-se geralmente quatro níveis de segurança biológica ("Biohazard") dependentes da perigosidade para o homem ou para o ambiente dos microorganismos que aí são manipulados. Estão tipificados os graus de contenção requeridos para os diferentes níveis de segurança biológica.

Nos trabalhos que se desenvolverão no laboratório durante a execução das práticas aplicar-se-á um nível de segurança 1, adequado para ensino e treino para graduação universitária. Este nível de segurança biológica não requer mais que a pele do próprio operador como barreira de contenção, porque os microorganismos utilizados não representam risco especial para o homem, quando manipulados de acordo com boas práticas laboratoriais, nem para o ambiente.

Um microorganismo normalmente não associado a doenças humanas poderá, contudo, ser lesivo em situações particulares, como a imunodeficiência ou outras.

### **REGRAS**

Para além do risco para o operador, associado à manipulação de microorganismos, as experiências que se realizarão são certamente novidade para alguns dos estudantes, com experiência laboratorial limitada e rotinas de boas práticas laboratoriais não estabelecidas. Importa, por isso, prevenir. É preciso proteger a saúde do próprio experimentador e de terceiros, que também poderão ser alvo de práticas menos adequadas. O sucesso das experiências dependerá do grau de rigor com que as mesmas forem executadas e dos baixos níveis de contaminações cruzadas que for possível manter.

É boa prática observar, cumprir e fazer cumprir as regras, procedimentos e comportamentos que se indicam:

#### **Acesso**

O acesso ao laboratório de microbiologia é restrito às pessoas qualificadas para o efeito, que incluem os estudantes / formandos apenas durante os períodos de aulas previstos.

#### **Bata**

O uso de uma bata comprida, limpa e devidamente ajustada ao corpo é indispensável sempre que se opere em laboratório. A bata protege o operador e o seu vestuário de eventuais acidentes. Idealmente a bata deverá ser usada apenas no laboratório de microbiologia, sendo

vestida à entrada e despida à saída. Desta forma, além de proteger o experimentador, a bata minimiza o transporte de microorganismos exteriores para o laboratório, permitindo a manutenção de uma baixa carga contaminante e evita a propagação indesejável no exterior dos microorganismos manipulados no laboratório.

### **Cabelos**

Os cabelos compridos deverão sempre ser atados e não é permitido o uso de peças de vestuário soltas, como batas desabotoadas, lenços de pescoço ou gravatas soltas. Além da movimentação excessiva de ar que provocam, a sua eventual inflamação nos bicos de gás poderá ter consequências desastrosas.

### **Mãos**

À entrada e à saída do laboratório é preciso lavar bem as mãos com abundante água e sabão, também para minimizar as contaminações cruzadas. Dependente do tipo de microorganismo a manipular, o uso de luvas impermeáveis, máscaras ou outras protecções, poderá ser exigível. Mesmo quando normalmente não recomendado, o uso de luvas poderá ser necessário em situações de solução de continuidade na pele das mãos do operador.

### **Comer e beber**

É expressamente proibido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto ou aplicar cosméticos durante a execução de experiências laboratoriais. Usar sempre pipetas mecânicas, nunca pipetar com a boca. É aconselhável adquirir o hábito de manter as mãos longe da boca.

### **Bancada de trabalho**

O local de trabalho deverá estar sempre devidamente limpo, para o que se impõe proceder à desinfecção da bancada antes de iniciados os trabalhos, para não permitir a contaminação das próprias experiências com microorganismos de sessões anteriores, e depois das manipulações terminadas para minimizar a propagação dos microorganismos com que se operou.

### **Livros e cadernos**

Só é permitido levar para a bancada o material de apoio estritamente indispensável à execução do trabalho, como o protocolo experimental, um bloco de notas ou um caderno e um lápis. Todos os restantes pertences do operador, como pastas, casacos ou sacos deverão ser acondicionados em local próprio, antes de iniciada a experimentação.

### **Materiais**

Todo o equipamento e material de laboratório amovível, utilizado durante a experimentação, deverá ser repostado no local indicado depois de concluída a sua utilização. Particularmente as placas e tubos contaminados para rejeitar deverão ser desinfectados ou colocados em local próprio para descontaminação.

### **Acidentes**

Qualquer acidente deverá ser de imediato reportado ao responsável pela sessão de trabalho. Líquidos ou outro material infectado, inadvertidamente transferidos para fora dos contentores a que se destinam deverão ser de imediato desinfectados com o apoio do responsável.

## **Planeamento**

Não iniciar qualquer experiência sem o conveniente planeamento. O conhecimento e compreensão prévios dos procedimentos experimentais, grelhas adequadas para registo dos resultados e a efectiva disponibilidade de todos os recursos materiais necessários constituem elementos importantes para o sucesso das experiências. O tempo "perdido" num planeamento inicial é largamente compensado pelo nível da aprendizagem conseguido e pela prevenção da necessidade de repetição de experiências eventualmente bloqueadas.

## **PROCEDIMENTOS GERAIS**

Todos os procedimentos deverão ser efectuados tendo em mente a minimização da contaminação do material em uso e a formação de aerossóis ou respingos. A manipulação de microorganismos viáveis ou de meios de cultura em placas ou tubos não fechados deverá ser efectuada nas proximidades da chama, onde o ambiente é menos propício à contaminação com outros agentes aéreos. Correntes de ar ou insectos voadores deverão ser evitados, quanto possível. Também no mesmo sentido deverão ser evitadas movimentações ou conversas desnecessárias durante a execução dos procedimentos laboratoriais.

## **REGISTOS E RELATÓRIOS**

É conveniente usar um bloco ou caderno para registo de todas as ocorrências e dos resultados da experimentação. Sugere-se o uso de caderno de laboratório, de preferência com folhas não amovíveis, por forma a que não sejam eliminadas notas ou registos considerados irrelevantes na altura, como sucede com frequência quando se passam os apontamentos "a limpo", mas de grande utilidade para consulta futura para eventual repetição da experiência. O rigor e pormenor dos registos efectuados facilitarão a aprendizagem, a interpretação dos resultados obtidos e a redacção posterior do relatório do trabalho.

Um qualquer relatório de uma experiência laboratorial deverá documentar de forma tão completa quanto possível o procedimento executado e os resultados obtidos. Para além disso deverá ser também objectivo do relator redigir um documento compreensível para o leitor e susceptível de apoiar a eventual repetição da mesma experiência em idênticas condições.

Para a elaboração dos relatórios sugerem-se, como orientação, as seguintes secções:

Título - Identificador do conteúdo do relatório.

Resumo - Pequeno texto de que constem os objectivos almejados e as conclusões obtidas.

Objectivo - Razão de ser do trabalho realizado.

Introdução - Dados conhecidos que justificam a realização da experiência relatada.

Palavras chave - Termos directamente relacionados com o trabalho.

Material e reagentes - Listagem exhaustiva do equipamento, reagentes e outro material usado

Protocolo experimental - Marcha geral dos procedimentos aplicados. Deverão ser relatados os procedimentos concretos executados, com referência a eventuais desvios relativamente ao procedimento recomendado / descrito.

Resultados - Registo das observações efectuadas e dos dados recolhidos.

Discussão - Comentário crítico aos resultados obtidos.

Conclusão - Descrição do cumprimento ou incumprimento do objectivo, decorrente dos resultados obtidos.

Nota crítica - Comentário à globalidade da experiência, com recomendações para a sua repetição.

Bibliografia - Referências consultadas ou utilizadas para a realização do trabalho.

Dependente do tipo do trabalho executado e da forma do relatório, algumas das secções descritas poderão ser fundidas, como "Resultados e discussão" ou "Discussão e conclusões", por exemplo.

## TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA

Os microorganismos são ubíquos. Podem encontrar-se no solo, no ar, na água, na comida, nos esgotos e nas superfícies corporais, entre outros locais. Ou seja, existem por todo o lado à nossa volta, o nosso ambiente está repleto de microorganismos. A microbiologia separa estas populações mistas em espécies individuais para efeitos do seu estudo. Uma cultura que contenha uma única espécie de células é designada por cultura pura. Para isolar e estudar os microorganismos em cultura pura, o microbiologista necessita de equipamentos laboratoriais básicos e da aplicação de técnicas específicas usando materiais particulares:

Equipamento	Autoclave Esterilização Ansam e agulhas. Pipetas Transferência de culturas Banhos de água e estufas Câmaras de cultura Frigoríficos	
Materiais	Meios de cultura Caldo nutritivo Semi-sólido Sólido Agar em rampa Agar profundo Placas de agar Tubos para cultura, Placas de Petri	
Técnicas	Espalhamento Riscado Incorporação / diluição	

### MEIOS DE CULTURA

A sobrevivência e o suporte de vida dos microorganismos depende do fornecimento adequado de nutrientes e convenientes condições para o seu crescimento. Quanto aos nutrientes, grande parte dos microorganismos apenas necessitam de substância solúveis de baixo peso molecular, usualmente originadas pela degradação enzimática de outros nutrientes mais complexos. Uma solução contendo estes nutrientes é designada como meio de cultura. Em geral, os meios de cultura são líquidos, semi-sólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é designado por caldo nutritivo. Um caldo nutritivo suplementado com um agente solidificante, usualmente o agar, origina um meio sólido ou semi-sólido. O agar é um extracto de algas marinhas, um carbo-hidrato complexo que contém maioritariamente galactose e possui muito pouco valor nutritivo. O agar é muito adequado como agente solidificante porque se liquefaz a 100°C e solidifica a 40°C. Devido a estas propriedades, os microorganismos, em especial os patogénicos, podem ser cultivados a temperaturas da ordem dos 37°C sem receios de liquefacção do meio solidificado. Um meio de cultura bem solidificado exige uma concentração de agar da ordem dos 1,5 a 1,8%. Uma concentração inferior a 1% resulta num meio semi-sólido. A grande vantagem e utilidade do meio sólido reside no facto da existência de uma superfície dura, em que os microorganismos podem crescer, adequada à utilização de técnicas especiais para o isolamento de colónias separadas. Cada colónia é formada por um conjunto de células resultantes da multiplicação de uma única célula e representa o crescimento de uma espécie microbiana única. Uma colónia bem definida e isolada constitui uma cultura pura. Além disso, o agar quando ainda sólido a temperatura elevada, pode ser distribuído por tubos de ensaio que, depois de arrefecidos e solidificado o meio servem para a cultura em profundidade, para teste da produção de gás, ou em meio inclinado para cultura em rampa, para teste de características ou preservação de culturas.

Para além das necessidades nutritivas, vários outros factores ambientais precisam de ser controlados para o sucesso da cultura dos microorganismos, como sejam o pH, a temperatura, o ambiente gasoso ou a pressão osmótica.

### **ESTERILIZAÇÃO**

A esterilização é ponto-chave para o sucesso do trabalho em microbiologia. Para trabalhar em condições de esterilidade é fundamental o uso de material estéril e a aplicação de técnicas adequadas. A esterilização é processo pelo qual são eliminadas todas as formas de vida de qualquer meio ou material. As principais técnicas para a esterilização de rotina no laboratório de microbiologia são as seguintes:

Calor	Calor seco (ar quente) 160°C a 180°C durante 1/2 hora a 3 horas Material de vidro em vazio Calor húmido (vapor) Circulação de vapor a 100°C. Esterilização intermitente (soluções termo-lábeis) Autoclave. Vapor sob pressão, temperaturas acima dos 100°C (meios de cultura, soluções termo-estáveis)
Filtração	Membranas filtrantes com poros de 0,05 um a 0.8 um Remoção de microorganismos de soluções termo-lábeis por filtração
Produtos químicos	Óxido de etileno Material de plástico Beta-propiolactona Tecidos vivos, materiais biológicos

### **TUBOS DE CULTURA E PLACAS DE PETRI**

Tubos de ensaio em vidro e placas de Petri em vidro e plástico constituem os principais suportes para o desenvolvimento das culturas de microorganismos. Um meio nutritivo adequado na forma de caldo nutritivo ou de agar é usado em tubos de ensaio, enquanto nas placas de Petri apenas se usa meio sólido. Um ambiente estéril é preservado nos tubos de cultura por vários tipos de tampas. Historicamente é o rolhão de algodão hidrófobo, desenvolvido por Schroeder e von Dusch no século dezanove. Hoje em dia, a maior parte dos laboratórios usam tampas em forma de manga, em metal ou plástico resistente ao calor. A vantagem destas tampas reside no facto de não exigirem tanto trabalho na sua preparação e serem mais facilmente removidas e reintroduzidas nos tubos.

As placas de Petri disponibilizam uma maior superfície para cultura e crescimento dos microorganismos. São compostas por uma base circular inferior, onde é colocado o meio e por uma tampa do mesmo formato e ligeiramente maior que se encaixa na base. Existem placas de Petri de várias dimensões para diferentes exigências laboratoriais. Na rotina são usadas placas de aproximadamente 15 cm de diâmetro. O meio nutritivo estéril, contendo agar, num volume de 15 a 20 ml é vertido nas placas quando ainda quente após fusão do agar e deixado arrefecer a temperatura inferior a 40°C. Depois de inoculadas com os microorganismos as placas são incubadas em posição invertida para evitar que as gotas de condensação, formadas na tampa durante o arrefecimento do agar, caiam sobre a superfície do agar.

### **INSTRUMENTOS PARA TRANSFERÊNCIA DE CULTURAS**

Existe a necessidade de transferir os microorganismos de um meio de cultura para outros, desde culturas de armazenamento e manutenção para culturas de análise, para o isolamento de culturas puras ou para a expansão da massa de microorganismos. É o processo de subcultura que



tem de necessariamente ser efectuado com técnica estéril para evitar potenciais contaminações das subculturas.

As ansas e agulhas, usualmente fabricadas com metais inertes como a platina e inseridas em cabos próprios para a manipulação, são instrumentos muito duráveis de fácil utilização. São facilmente esterilizáveis no momento da sua utilização por incineração à chama, numa posição quase vertical até o metal ficar ao rubro. Importará depois deixar arrefecer entre 10 a 20 segundos, fora da chama, mas na sua proximidade, onde a carga de microorganismos ambientais viáveis é inferior. Depois de arrefecidos, para não inactivar os microorganismos a transferir, podem ser usadas para "picar" uma cultura sólida ou líquida e inocular outro meio. Uma vez esterilizada, a ansa deverá ser de imediato utilizada antes de ser de novo colocada na bancada.

As pipetas são outros dos instrumentos de transferência de culturas de uso muito generalizado. São calibradas e permitem a transferência de quantidades de culturas líquidas preestabelecidas. São de vidro ou plástico, com uma extremidade afilada e outra para a aspiração e expulsão do líquido que contenham. Podem ser esterilizadas por calor seco ou húmido, conforme o tipo de material de que são constituídas. Apesar de tradicionalmente serem instrumentos para "pipetar à boca" é proibido usar a boca para aspirar microorganismos. Existem auxiliares mecânicos disponíveis para o efeito, como peras de borracha ou corpos de seringa que se adaptam na extremidade larga da pipeta.

### **CÂMARAS DE CULTURA**

Das condições para crescimento dos microorganismos, uma das mais relevantes é a sua temperatura óptima de crescimento. As estufas são usadas para a manutenção da temperatura óptima dos microorganismos em crescimento durante o período de cultura. São câmaras em que a temperatura ambiente interior é controlada por termostato, de forma a que a mesma seja mantida dentro de limites apropriados para o crescimento celular. Usam em geral um sistema de circulação de ar aquecido e, para evitar a desidratação dos meios em incubação, deverão conter também uma fonte de vapor de água (um copo com água no seu interior, por exemplo).

Os banhos de água (banho-maria) com água a temperatura controlada por termostato constituem outro dos instrumentos frequentemente empregues para a criação das condições de temperatura óptima de crescimento dos microorganismos. O íntimo contacto da água a temperatura controlada com o recipiente onde crescem os microorganismos apresenta a vantagem de permitir uma mais rápida e eficaz transferência do calor. Além disso, os banhos com agitação facilitam também o arejamento das culturas, de grande importância para o crescimento dos microorganismos aeróbios. A desvantagem do banho de água reside no facto de só poder ser usado para as culturas em meio líquido, ao contrário das estufas de ar, que servem tanto para culturas em meio líquido como em meio sólido.

### **FRIGORÍFICO**

O frigorífico é outra das peças fundamentais em laboratório de microbiologia. O ambiente de baixa temperatura que disponibiliza é da maior relevância para a manutenção e armazenamento das culturas em fase de não crescimento entre os períodos de subcultura, e para a conservação dos meios esterilizados e outros reagentes. Também as soluções e compostos termo-lábeis têm períodos de conservação mais alargados quando armazenados a baixas temperaturas.

## MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Esterilização é um processo que elimina todos os organismos vivos que se encontrem à superfície ou no interior de um material, podendo ser alcançado pela exposição do material a agentes letais físicos ou químicos ou, no caso dos líquidos, pela separação mecânica dos organismos através de filtrações. Existem muitas formas de esterilizar materiais e meios, e a sua escolha depende da natureza dos materiais a serem esterilizados bem como da disponibilidade de meios de trabalho.

A noção de esterilidade (estéril = infecundo) encontra-se frequentemente associada a duas outras: a de assepsia (ausência de sepsis = putrefacção) e a de desinfecção (livrar da infecção). Estes significados literais correspondem, de facto, às noções técnicas destas terminologias. Em microbiologia referimo-nos a esterilização quando se pretende impedir a propagação de microorganismos; a assepsia quando se pretende trabalhar em ambiente desprovido de microorganismos e a desinfecção quando se aplicam técnicas destinadas a eliminar microorganismos potencialmente patogénicos para o operador.

Destas noções, a adquirir no exercício da experimentação que se desenvolverá na disciplina, importa considerar em particular as técnicas que se utilizam em microbiologia para a eliminação de microorganismos viáveis: a esterilização.

### ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR

#### A. Calor Húmido

O aparelho mais usado para esterilizar materiais e meios de cultura é a autoclave. As autoclaves trabalham à semelhança de panelas de pressão domésticas. As autoclaves de laboratório operam normalmente sob uma pressão de 1,02 Bar a uma temperatura de 121°C. A autoclave esteriliza a maioria dos materiais em 15-30 minutos, sendo a variação do tempo de esterilização devida à relação superfície/volume dos materiais a serem esterilizados.

#### Aspectos da esterilização por vapor-pressão

##### *Temperatura*

Os endosporos das bactérias são as formas de vida mais resistentes ao calor, e a sua destruição pode ser conseguida se for aplicado vapor sobre pressão. Uma temperatura de 121°C oferece uma boa margem de segurança se for mantida durante um espaço de tempo apropriado.

##### *Humidade*

A coagulação do protoplasma bacteriano em temperaturas moderadas requer humidade e há medida que esta é removida a temperatura necessária para haver coagulação aumenta rapidamente. Se o vapor for sobreaquecido ficará mais "seco" o que ocasiona um aumento da temperatura e do tempo de exposição para a esterilização, que na situação extrema de esterilização em calor seco será de 170°C durante uma hora. Em conclusão, vapor excessivamente quente perde alguma da sua eficácia como agente letal para além de poder ser lesivo para os materiais a serem tratados.

##### *Pressão*

A pressão, nos valores usados na autoclave, por si só não exerce qualquer efeito na esterilização, sendo útil para elevar a temperatura do vapor acima dos 100°C.

### *Tempo*

O tempo é necessário para que o vapor penetre e aqueça os materiais a serem esterilizados. Mesmo quando as temperaturas de esterilização são atingidas, os esporos ( e as células vegetativas) não são todos mortos de uma vez. A velocidade de morte é uma constante a uma dada temperatura e por cada unidade de tempo de exposição ao agente letal, uma proporção constante de uma dada população é morta. Normalmente demora 11 a 12 minutos a 121°C (calor húmido) para matar os endoesporos das bactérias termofílicas.

### *Purga*

O ar relativamente frio na câmara de esterilização é muito mais pesado que o vapor à temperatura de esterilização. Se não for permitida a saída do ar cria-se uma estratificação no autoclave que conduz a uma falta de uniformização das temperaturas desenvolvidas. Uma vez que o ar e o vapor são lentos a misturarem-se, as diferenças de temperatura entre camadas pode ser muito grande, por isso a necessidade de se substituir todo o ar por vapor (purga).

### *Natureza do carregamento*

Geralmente, os materiais mais volumosos requerem um maior tempo de esterilização, sendo preferível esterilizar pequenos volumes de cada vez, por exemplo é preferível esterilizar 5 balões de litro de cada vez do que esterilizar apenas um balão com cinco litros. Os frascos devem ser tapados com algodão ou papel. Se for necessário usar rolhas roscadas, devem ir pouco apertadas para a autoclave de modo a permitirem a saída de ar e entrada de vapor, evitando-se assim o rebentamento de frascos na autoclave.

### Procedimento para operação da autoclave

- Verificar as tampas dos frascos (não apertadas, para permitir a troca de gases com o exterior).
- Introduzir na autoclave o material a esterilizar.
- Fechar a autoclave e apertar a tampa seguindo os cuidados adequados recomendados.
- Abrir a torneira de saída de vapor para permitir a purga do ar no interior.
- Ligar a corrente eléctrica e colocar o termostato para a posição máxima.
- Aguardar que a corrente de vapor que sai pela torneira seja bastante intensa. (Completa substituição do ar no interior por vapor de água)
- Fechar a torneira de saída do vapor.
- Aguardar que o termómetro atinja a temperatura de esterilização desejada (121°C), ou que o indicador de pressão marque 1,02 Bar.
- Reduzir a potência do termostato de modo a manter constante a temperatura.
- Atingida a temperatura de esterilização, iniciar a contagem do tempo (por exemplo 20 minutos).
- Desligar a autoclave.
- Aguardar até o indicador de pressão indicar 0.
- Abrir a torneira de purga (pode ainda haver pressão e o ar estará muito quente).
- Abrir a autoclave. Remover os materiais esterilizados,  
(ATENÇÃO: os materiais esterilizados podem estar muito quentes)
- Depois do arrefecimento conveniente fechar os frascos mal roscados

### B. Calor seco

O calor seco é usado para esterilizar material de vidro, outros materiais sólidos termoestáveis e alguns componentes de meios ou alimentos que ficariam impróprios se expostos ao vapor. Trata-se também de um dos métodos de esterilização mais usados e de muito fácil aplicação. O equipamento indispensável é apenas uma estufa de alta temperatura (160 - 200°C). Para além de ter de ser tida em conta a resistência térmica dos materiais a esterilizar por esta técnica, a

outra precaução a considerar prende-se com a minimização da possibilidade de contaminar esses materiais depois da esterilização.

### **C. Esterilização por gases**

O recente incremento do uso de material de plástico de utilização única ("disposable") como seringas, caixas de Petri, tubos de cultura, filtros, etc., levou ao desenvolvimento de uma nova forma de esterilização que usa gases tóxicos para a eliminação dos microorganismos de materiais termo-sensíveis. A aplicação desta técnica requer a utilização de equipamentos próprios que forcem a circulação do gás tóxico através de todas as superfícies dos materiais, o que a torna de difícil utilização em laboratórios de tipo não industrial.

O óxido de etileno é o gás usado com maior frequência neste tipo de esterilizações. Este gás, ao contrário de muitos produtos químicos tóxicos, é pouco corrosivo e não altera os materiais a serem esterilizados, sendo facilmente removido por arejamento. As suas desvantagens incluem a necessidade de longos períodos de exposição para se obter a esterilização (várias horas), a reactividade com componentes dos meios e certos tipos de plásticos e a necessidade de equipamentos próprios e disponibilidade do gás, como se referiu.

### **D. Radiações**

Alguns processos comerciais usam as radiações para a esterilização a frio de certos materiais como produtos farmacêuticos, por exemplo. A irradiação é o uso de radiações ionizantes de alta energia que incluem raios gama produzidos a partir de cobalto-60 ou cézio-139 e de raios catódicos produzidos em geradores e aceleradores de electrões.

A irradiação com luz ultravioleta não é uma forma muito satisfatória de esterilização dada a sua fraca capacidade de penetração nos materiais e produtos a esterilizar. É, contudo, de utilização frequente na diminuição do nível de contaminação de espaços confinados, como salas estéreis ou pequenos ambientes.

### **E. Filtração estéril**

O principal método para a esterilização de líquidos que contenham componentes termo-sensíveis tais como vitaminas, proteínas séricas e antibióticos, por exemplo, é a filtração.

Tradicionalmente os microbiologistas esterilizavam estes produtos recorrendo a filtros feitos a partir de terra de diatomáceas e fibras de asbesto, previamente esterilizados em autoclave. Presentemente estes filtros foram substituídos por filtros de acetato de celulose ou policarbonatos nos quais os tipos de poros desenvolvidos permitem filtrações com elevados graus de precisão. Existem actualmente disponíveis no mercado filtros esterilizantes de vários poros e capacidades filtrantes. Os mais frequentes e, por isso, mais acessíveis são filtros de poros de 0,45 µm ou 0,2 µm de diâmetro, que retêm os microrganismos presentes nas soluções.

Para esterilizar uma solução por filtração, não há mais que passar essa solução através de um destes filtros pela aplicação de uma pressão positiva no líquido a filtrar (filtros de seringa, por exemplo) ou na rarefacção do ar no contentor que recebe o filtrado. Em qualquer dos casos esta técnica requer a recolha do filtrado em condições de assepsia para impedir a contaminação do líquido esterilizado.

## O MICROSCÓPIO

A Microbiologia é, por definição, uma ciência que estuda os organismos vivos demasiado pequenos para poderem ser vistos a olho nu. Necessário será, por isso, usar microscópios para poder observar os microorganismos. Se bem que existam vários tipos de microscópios, todos eles são basicamente constituídos por dois sistemas de lentes, uma fonte de luz e mecanismos mecânicos de ajuste das distâncias focais.

### COMPONENTES PRINCIPAIS DO MICROSCÓPIO

#### Platina

A platina do microscópio é uma plataforma com uma abertura central para permitir a passagem da luz, abaixo dos sistemas de lentes. Esta plataforma constitui a superfície de suporte para colocação das amostras. Em geral as amostras de microorganismos são colocadas em lâminas de vidro transparente sobre a abertura central da platina. A maior parte dos microscópios têm também mecanismos mecânicos que permitem a movimentação das lâminas na horizontal para posicionamento da amostra.

#### Fonte luminosa

A fonte de luz encontra-se por baixo da amostra. A iluminação pode ser exterior ao microscópio, natural ou artificial, conduzida para a amostra por espelhos que a concentram ou ser proveniente de uma fonte própria directamente dirigida por lentes.

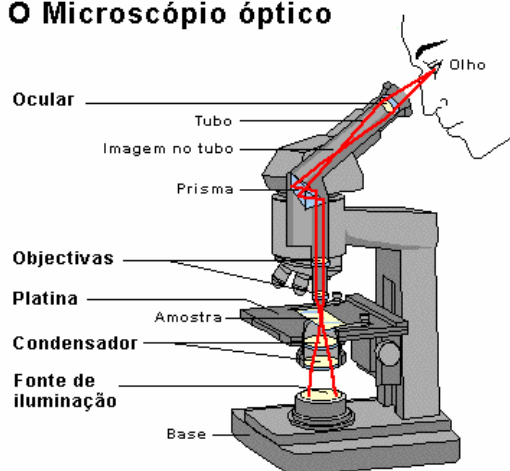
#### Condensador

Este componente encontra-se imediatamente abaixo da platina e é constituído por lentes que permitem a concentração da luz nos sistemas das lentes de amplificação, depois de passar pela amostra a ser observada. Usualmente tem também acoplado um diafragma para regulação do nível de luminosidade adequado à observação.

#### Lentes

O corpo do microscópio é constituído por um tubo onde estão alojados os dois sistemas de lentes para ampliação. No cimo do tubo existem as oculares, por onde se observa, e no extremidade inferior as objectivas que recolhem a luz proveniente da fonte de iluminação depois de passar pela amostra. Um sistema mecânico permite aproximar e afastar a objectiva do objecto de acordo com a ampliação a usar e para focagem.

#### **O Microscópio óptico**



## **PRINCÍPIOS TEÓRICOS**

Para a utilização eficiente do microscópio convirá compreender os princípios básicos do microscópio, que a seguir se indicam.

### **Ampliação**

A capacidade de ampliação depende dos conjuntos de lentes instaladas no tubo do microscópio: a ocular e a objectiva. A objectiva, na parte inferior do tubo, produz uma imagem real projectada no plano focal, imagem essa depois ampliada pela ocular para a produção da imagem final observável. Os microscópios mais frequentes são equipados com um tambor que contém várias objectivas com diferentes capacidades de ampliação. A ampliação total da amostra resulta do produto da capacidade de ampliação da objectiva pela capacidade de ampliação da ocular:

Ampliação		Ampliação final (Objectiva X ocular)
(Objectiva)	(Ocular)	
4 X	10 X	40 X
10 X	10 X	100 X
45 X	10 X	450 X
100 X	10 X	1000 X

### **Resolução**

Apesar da ampliação ser importante, deve notar-se que não é ilimitada pelo simples aumento da capacidade de ampliação das lentes oculares e objectivas. A capacidade de ampliação das lentes está limitada pelo seu poder de resolução. O poder de resolução é definido pela capacidade da lente em permitir a identificação de dois objectos adjacentes como entidades discretas. Quando a discriminação deixa de ser possível, isto é, quando dois objectos se confundem num só, a lente perdeu a sua capacidade de resolução. Maiores ampliações não corrigem esta perda, apenas permitem a observação de imagens dos objectos cada vez mais difusas. O poder de resolução de uma lente depende do comprimento de onda da luz, da abertura numérica, característica de cada lente e dependente do seu diâmetro e da relação deste com a distância focal e do índice de refração do material da lente.

### **Iluminação**

Para uma boa observação é necessário que a quantidade de luz seja apropriada à ampliação. A iluminação é regulada pelo condensador e pelo diafragma que permitem uma concentração da luz na amostra em quantidades apropriadas. Demasiada luz obscurece o objecto, por falta de contraste e luz insuficiente não permite a observação. A intensidade da luz para a observação depende também do tipo de amostra a observar, do nível da sua transparência e/ou concentração.

Com regra, quando a ampliação das lentes aumenta, diminui a distância de trabalho (entre a objectiva e o objecto) e aumenta a abertura numérica (exige mais luz). As relações práticas aproximadas entre as distâncias de trabalho e as objectivas são:

Objectiva	Distância de trabalho	Objectiva	Distância de trabalho
4 X	9 - 10 mm	45 X	0,5 - 0,7 mm
10 X	5 - 8 mm	100 X	0,13 - 0,18 mm

### **OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO**

Os passos que se indicam deverão ser cumpridos para uma correcta e eficiente utilização do microscópio.

Afastar a objectiva da platina

Colocar a lâmina na platina de forma a centrar o objecto da observação

Rodar o tambor das objectivas posicionando a de menor ampliação

Aproximar a objectiva da lâmina a uma distância inferior à prevista (ver tabela acima). Nunca movimentar o tubo observando pela ocular.

Afastar a objectiva da lâmina, observando pela ocular, até à obtenção de uma imagem nítida

Regular a intensidade luminosa e focagem usando o diafragma (ou regulador da fonte de iluminação) e o condensador

Centrar no campo visual o microorganismo a observar

Muitos microscópios uma vez focados com a objectiva de menor ampliação ficam focados para as restantes

Rodar o tambor das objectivas para a ampliação pretendida (a observação com objectiva de 100 requer o uso de óleo de imersão entre a lente e a lâmina)

Acertar a focagem com o parafuso micrométrico

Observar e registar observação, movimentando a lâmina na horizontal, se necessário

Remover a amostra. Limpar a platina e a lente. Posicionar a objectiva de menor ampliação. Descer o tubo ocular.

## MORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS

A morfologia dos microorganismos só pode ser observada ao microscópio. Mas devido ao seu reduzido tamanho e ao seu índice de refração, muito próximo do índice de refração da água, não é fácil a observação microscópica de microorganismos em geral e de bactérias em particular. Sendo também, em geral, não pigmentadas, a observação microscópica só se torna acessível aumentando o contraste entre o meio envolvente e o conteúdo celular. Para permitir o estudo das propriedades das bactérias e classificá-las em grupos para efeitos de diagnóstico, várias colorações biológicas e procedimentos específicos foram desenvolvidos.

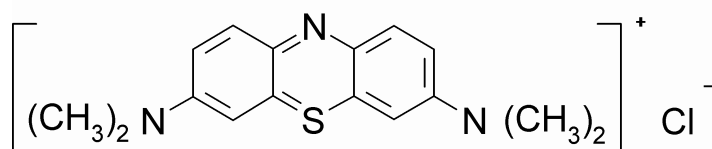
### CORANTES

Quimicamente um corante pode ser definido como um composto orgânico que contém um núcleo benzénico ligado a um cromóforo e a um grupo auxocrómico:

Benzeno +	Solvente orgânico incolor	Cromogénio: Composto corado (não corante)	Corante
Cromóforo +	Grupo químico que introduz cor no anel benzénico		
Auxocromo	Grupo químico ligado ao cromogénio e que pode ligar-se às estruturas celulares		

Um dos corantes frequentemente usados para contrastar o meio citoplasmático de bactérias e células é o azul-de-metileno. Quando em solução ioniza-se, originando um cromogénio positivamente carregado, e reage reversivelmente com os componentes celulares de carga negativa. A imagem documenta as três partes constituintes do corante: núcleo benzénico, Cromóforo (anéis aromáticos com duplas ligações) e o auxocromo (ião cloreto):

### AZUL DE METILENO



Quanto às suas características iónicas, os corantes podem ser básicos ou catiónicos (como o azul de metileno) e ácidos ou aniónicos que se ionizam em cromogénios de carga negativa e se ligam às estruturas celulares de cargas positivas.

As técnicas de coloração podem subdividir-se em técnicas simples para visualização directa da morfologia, como é exemplo o azul-de-metileno, ou diferenciais, que possibilitam a discriminação entre tipos morfológicos diferentes de bactérias ou determinadas estruturas subcelulares.

Tipos de colorações	Coloração negativa	Coloração do meio envolvente das bactérias	Nigrosina Tinta da china
	Coloração simples	(Morfologia - cocos, bacilos, etc. - e associações entre bactérias - pares, cadeias, cachos, etc.)	Ácidos Básicos Indiferenciados
	Coloração diferencial	Separação entre grupos	Gram Ácido-resistente
		Visualização de estruturas	Flagelos Cápsulas Esporos Núcleos



## Coloração de Gram

A coloração de Gram, desenvolvida em 1884, é a coloração diferencial mais utilizada em microbiologia e permite classificar as bactérias em dois grupos: as Gram negativas e as Gram positivas.



	Parede rígida	Parede externa	
Peptidoglicano	+	—	+
Ácido Teicoico	—	—	+
Polisacáridos	—	—	+
Proteína	—	—	+
Lipopolisacáridos	—	+	—
Lipoproteína	+ ou —	+	—
Ácido resistentes	nunca são		podem ser
Sensibilidade a:			
Sulfamidas	pouco sensíveis		muito sensíveis
Penicilina	pouco sensíveis		muito sensíveis
Azida de sódio	pouco resistentes		resistentes

O processo da coloração baseia-se na capacidade que certos microorganismos possuem em reter a coloração do cristal violeta por descoloração com álcool, são as Gram positivas. As que se deixam descolorar, as Gram negativas, são depois contrastadas com um corante de cor diferente.

A capacidade de reter a coloração inicial, nas condições do procedimento, é devida à diferente estrutura da parede celular (ver imagem e tabela de características). Em particular as várias camadas do peptidoglicano existente nas bactérias Gram positivas são responsáveis por impedir a remoção dos complexos, que se formam entre o cristal violeta e o mordente (substância que aumenta a afinidade entre a célula e o corante), no passo da lavagem com álcool.

Basicamente a coloração de Gram consta de uma exposição inicial da bactéria ao cristal violeta, após o que é adicionada uma solução de iodo. O iodo penetra com facilidade na célula e forma complexos insolúveis com o cristal violeta. A adição do álcool no passo seguinte permite a eliminação dos complexos por passagem através da fina camada de peptidoglicano das Gram negativas, mas é insuficiente para os fazer passar através da grossa camada das gram positivas. Depois da lavagem com o álcool, as Gram negativas, que ficaram descoloradas, são contrastadas com um segundo corante, de cor diferente e menos intenso que o primeiro. O passo crítico é a remoção dos complexos do cristal violeta - iodo pelo álcool. Um tratamento excessivo pode descolorar as bactérias Gram positivas e um tratamento insuficiente não removerá a cor violeta das bactérias gram negativas.

## MEIOS DE CULTURA

### TIPOS DE MEIO

Existem vários tipos de meios em que as bactérias podem crescer. Os meios podem ser definidos ou complexos.

Nos meios quimicamente definidos, quantidades determinadas de reagentes químicos puros são misturados para a preparação do meio de cultura. Contém, em geral, sais inorgânicos que incluem fontes de carbono e de azoto. Outros componentes indispensáveis ao crescimento bacteriano são necessários em tão pequenas quantidades que as pequenas contaminações dos reagentes químicos usados na preparação do meio são suficientes.

Meios complexos, que contém todos os ingredientes necessários ao crescimento do microorganismo, são compostos por misturas de proteínas e outros extractos de origem biológica, em que as quantidades precisas de cada aminoácido ou glúcido, por exemplo, não são conhecidas. Alguns dos componentes dos meios complexos são resultantes de digestões preliminares de produtos biológicos. Estas digestões permitem uma melhor acessibilidade do microorganismo aos materiais plásticos de que necessita. Peptonas e triptonas, hidrolizados enzimáticos de proteína animal e de levedura, respectivamente, são dois frequentes constituintes dos meios complexos.

Um exemplo de cada um destes dois tipos de meio:

<i>Meio definido</i>		<i>Meio complexo</i>	
NaNO <sub>2</sub>	0.1 g/l	Triptonas	5,0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l	Extracto de levedura	2,5 g/l
CaCO <sub>3</sub>	5.0 g/l	Glucose	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g/l	Agar	15,0g/l
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.005 g/l		
NaCl	0.5 g/l		

Para além de definidos ou complexos, os meios de cultura poderem também ser classificados de outras forma, Nomeadamente:

**Meios Enriquecidos** - Quando contém também alguns importantes factores de crescimento como vitaminas, aminoácidos ou componentes do sangue. São meios necessários para fazer crescer microorganismos mais exigentes;

**Meios Selectivos** - A utilização deste tipo de meios permite a selecção de um microorganismo particular de entre uma população em que os restantes microorganismos presentes não conseguem crescer. Os aditivos para tornar estes meios selectivos são os antibióticos ou outros compostos tóxicos;

**Meios Diferenciais** - Como o nome indica, este tipo de meio permite a separação de microorganismos de diferentes características, como a coloração das colónias ou da região envolvente do meio de cultura.

**Meios Salinos Mínimos** - São meios quimicamente definidos que contém apenas os sais inorgânicos indispensáveis ao crescimento bacteriano (o exemplo de meio definido atrás é um meio salino mínimo). Uma determinada fonte de carbono pode ser adicionada, dependendo do tipo de microorganismo a fazer crescer no meio.

Alguns meios podem ser considerados, em simultâneo, englobados em mais de uma das categorias indicadas. Um agar salino de manitol, por exemplo, é um meio complexo, diferencial e selectivo.

### **PREPARAÇÃO**

A preparação prática de um meio de cultura é relativamente simples e pode ser conseguida com sucesso se as regras seguintes forem devidamente aplicadas:

Usar sempre material de vidro bem lavado e enxaguado com água destilada, para evitar contaminações com detergentes ou outros químicos;

Usar sempre espátulas limpas na pesagem dos componentes;

Os rótulos dos meios desidratados contêm instruções para a sua preparação e referência às quantidades de água para a sua dissolução;

Os componentes devem ser pesados individualmente para recipientes individuais. Nunca devolver ao frasco original quaisquer quantidades do componente removidas em excesso;

É preferível adicionar os componentes a água previamente colocada no vaso para a dissolução. O contrário pode originar a formação de agregados colados ao fundo do frasco de difícil dissolução;

Se o meio contem muitos componentes é preferível dissolvê-los individualmente antes de efectuar a mistura. A adição de agar deverá ocorrer no fim da preparação e só depois dos restantes componentes já se encontrarem dissolvidos;

Não preparar nenhum meio se não for possível esterilizá-lo de imediato;

Nunca autoclavar um meio em frasco que esteja a mais de meio. As rolhas ou tampas não deverão estar apertadas durante a autoclavagem.

## **CONTAGENS DE MICROORGANISMOS**

Os estudos em microbiologia obrigam com frequência à determinação do número de microorganismos num determinado volume, para caracterização da população presente numa certa amostra, ou para avaliação do crescimento do microorganismo em consideração. Vários métodos podem ser usados para o efeito, dependendo do tipo de microorganismo, dos recursos laboratoriais disponíveis e do objectivo do estudo.

### **AVALIAÇÃO DIRECTA**

O método por ventura mais simples e rápido é executado por diluição da amostra e contagem directa dos microorganismos ao microscópio.

Dada uma população de microorganismos a quantificar, há que diluí-la de forma apropriada e contar o número total de microorganismos num determinado volume da diluição. Existem lâminas de microscópio que contém câmaras de contagem de volumes conhecidos. Estas câmaras permitem a determinação da concentração de microorganismos na amostra de partida por cálculos efectuados a partir do número de microorganismos observados na superfície delimitada.

Sendo um processo prático, não é, contudo, aplicável a fungos ou bolores, por exemplo, onde é difícil identificar células individuais ao microscópio. Para estas situações, outras medidas indirectas são aplicáveis. A pesagem da matéria seca (após eliminação do meio de cultura ou solvente) constitui um indicador da massa presente na amostra, por exemplo.

A avaliação da capacidade de uma suspensão de microorganismos em dispersar e absorver a luz incidente é, dentro de certos limites, proporcional à concentração da matéria insolúvel em suspensão. Utilizando espectrofotómetros apropriados é possível construir curvas de absorção, de dispersão ou reflexão da luz em função da concentração de determinado microorganismo em suspensão. Dada uma amostra problema, o seu comportamento face a um raio de luz incidente permite posicionar o resultado observado na curva padrão e assim determinar a sua concentração relativa.

Quaisquer destes métodos permitem determinar o número de microorganismos numa unidade de volume da amostra em estudo, mas não fornece indicações sobre as concentrações de microorganismos viáveis ou cultiváveis.

### **CONTAGEM DE VIÁVEIS**

Os métodos de contagem após crescimento permitem a avaliação das populações de microorganismos viáveis e baseiam-se na capacidade de desenvolvimento de uma cultura (ou colónia), a partir de uma única célula. A partir da amostra em estudo procede-se a diluições sucessivas, inoculação de meios de cultura apropriados e avaliação do número de microorganismos cultiváveis.

Quando se pretende determinar o número de microorganismos presentes em amostras de leite ou água, por exemplo, usa-se a chamada técnica de contagem em placa. Estas contagens são efectuadas por incorporação de um volume conhecido da amostra (frequentemente diluída), em agar nutritivo adequado e conveniente incubação. Da mesma forma o espalhamento uniforme de um volume conhecido da amostra na superfície de um agar sólido origina a formação de colónias discretas, cada uma delas proveniente de um microorganismo que se posicionou nesse local. A concentração de microorganismos presentes na amostra inicial é calculada a partir do número total de colónias que se desenvolveu na placa, das diluições efectuadas e do volume de diluição incorporado ou espalhado sobre o agar.

Quando a concentração de microorganismos na amostra em estudo é baixa as contagens de microorganismos são efectuadas após conveniente concentração da amostra. Para o efeito é regra proceder-se à filtração de um volume conhecido da amostra por filtros esterilizantes (que

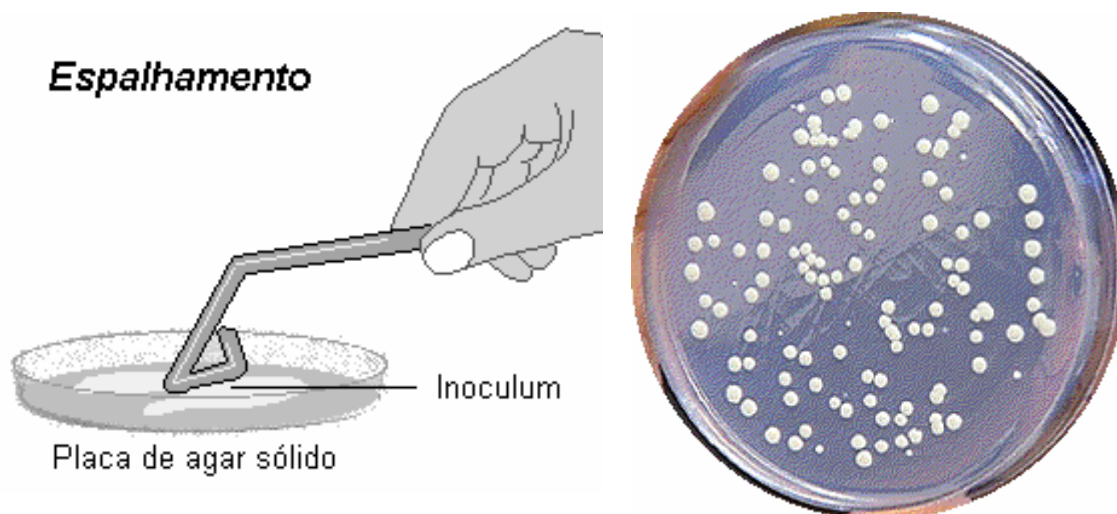
retém as bactérias presentes) e inoculação do filtro sobre superfície de agar nutritivo. Nos locais do filtro em que foram retidas bactérias haverá o desenvolvimento de uma colónia e o número total de colónias corresponderá ao número de bactérias cultiváveis presentes no volume de amostra filtrado.

As contagens podem também ser efectuadas por crescimento microbiológico em meio líquido. Para tanto há que proceder a múltiplas diluições sequenciais da amostra em estudo, até para além da probabilidade de existência de um só microorganismo no volume de diluição a inocular no meio de cultura. Após conveniente incubação de todos os meios inoculados, observar-se-á o crescimento até uma certa diluição e ausência de crescimento nas maiores diluições subsequentes. Tendo em conta a primeira diluição em que se não observa crescimento e a última em que ainda existe esse crescimento (correspondente à inoculação de, pelo menos, uma bactéria), o número de réplicas efectuadas e as diluições sequenciais, determina-se o número mais provável de microorganismos presentes na amostra inicial, de acordo com procedimentos estandardizados e tabelas estatísticas apropriadas.

## ISOLAMENTO DE COLÓNIAS EM MEIO SÓLIDO

### SEMENTEIRA POR ESPALHAMENTO

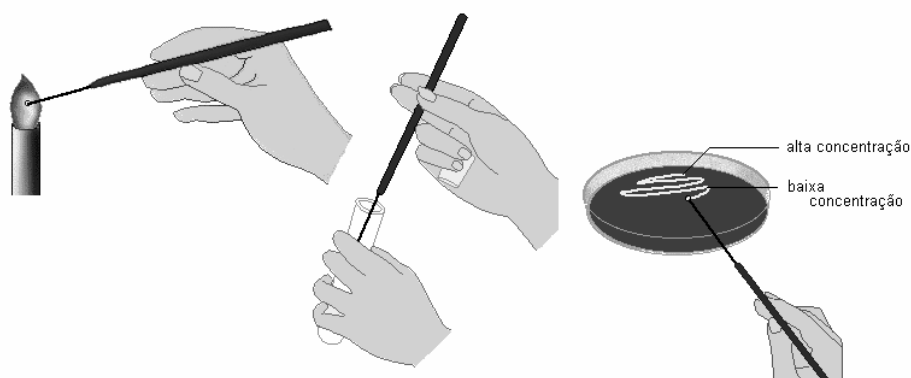
Se aplicarmos uma alígota de cultura bacteriana líquida ou suspensão de bactérias sobre a superfície de um meio com agar numa caixa de Petri, e se a espalhamos uniformemente com uma vareta de vidro dobrada (semeador de vidro) ou com o auxílio de pequenas esferas de vidro esterilizadas, de tal maneira que as células bacterianas presentes fiquem uniformemente afastadas umas das outras, após incubação obteremos colónias individualizadas.



Para o sucesso no isolamento de colónias pela técnica do espalhamento é necessário que o número de bactérias viáveis presentes seja discreto e não muito elevado. Para uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro é adequado utilizar um número de bactérias da ordem da centena. Se o número de bactérias total da suspensão a usar não é conhecido, deverão efectuar-se diluições prévias do inócuo.

### SEMENTEIRA POR RISCADO

A técnica conhecida como riscado é das mais frequentemente empregues em microbiologia para o isolamento de colónias, dada a facilidade da sua execução.



Existem várias técnicas de riscado, todas elas dando excelentes resultados se executadas correctamente. O objectivo do riscado é o de produzir colónias bem separadas umas das outras a

partir de uma suspensão de células concentrada. As células ficam muito juntas no início do riscado, dando colónias confluentes, mas à medida que o riscado continua cada vez menos células permanecem na ansa ocasionando a que se depositem cada vez mais afastadas umas das outras no meio de cultura, formando colónias cada vez mais separadas (Ver Figura). Uma boa placa de riscado resulta de vários movimentos contínuos ou descontínuos (com esterilização à chama e arrefecimento) da ansa ou semeador ao longo da placa.

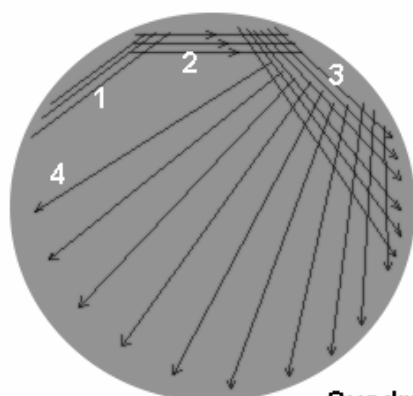
Antes de executar os seus riscados em placa atente na demonstração feita, dando especial atenção à esterilização da ansa entre cada série de riscos, bem como ao seu arrefecimento subsequente (para não inactivar as células a que vai tocar a seguir).

### Procedimento geral

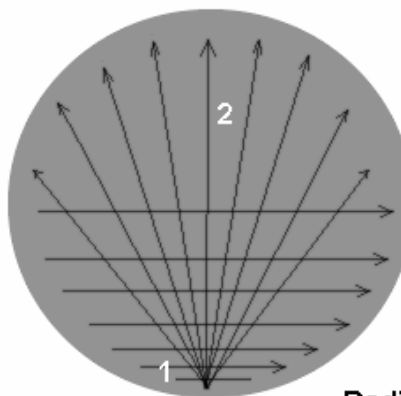
Utilize placas de Petri com LB/agar/amp. Com a ansa de inoculação, risque cuidadosamente uma cultura mista sobre as placas utilizando uma das técnicas ilustradas na figura. Preste atenção à força com que aplica a ansa na superfície do agar, de forma a não a rasgar.

Coloque as placas, em posição invertida, na estufa de incubação a 37°C. Não esquecer de identificar convenientemente as placas com o seu nome, data e conteúdo.

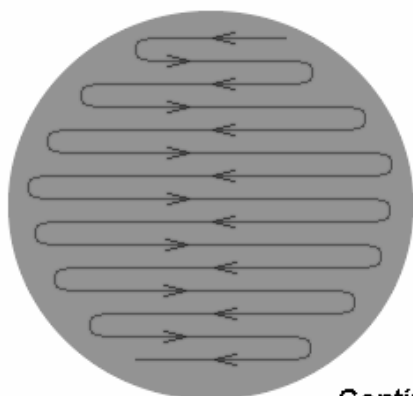
Após incubação, estude o crescimento bacteriano das nas placas. Observe as diferenças em termos de forma, tamanho e aparência das colónias formadas. Avalie se a técnica de riscado foi aplicada correctamente para o isolamento de colónias.



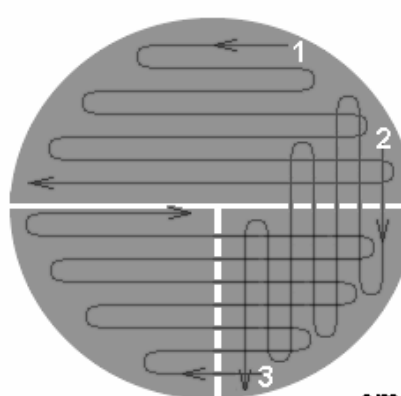
**Quadrante**



**Radiante**



**Contínuo**



**em T**

## CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CRESCIMENTO DOS MICROORGANISMOS

Para além dos nutrientes para a síntese dos seus componentes vitais e da energia química necessária ao seu metabolismo, outras condições ambientais são necessárias para um adequado crescimento microbiano no laboratório. Entre os parâmetros a controlar merecem especial destaque as concentrações relativas de oxigénio, os valores do pH no meio e a temperatura para o seu crescimento.

### OXIGÉNIO

Entre os microrganismos existe uma grande variação quanto às suas necessidades em oxigénio.

Os aeróbios estritos (ou obrigatórios) crescem apenas na presença de oxigénio. Encontram-se normalmente à superfície de plantas, nas camadas superficiais do solo e em suspensão nas poeiras. Estes organismos possuem apenas metabolismo respiratório e usam o oxigénio como único aceitador final na sua cadeia transportadora de electrões.

Os anaeróbios estritos (ou obrigatórios) não necessitam de oxigénio para o seu crescimento, o oxigénio é de facto tóxico para este tipo de microrganismos. Encontram-se geralmente em zonas pantanosas, no estômago dos ruminantes, no interior do intestino humano e de outros animais não ruminantes ou alojados nos tecidos de feridas profundas, o metabolismo deste tipo de microrganismos é normalmente fermentativo.

Os microrganismos com metabolismo fermentativo, e que portanto não usam oxigénio no seu metabolismo, mas que a sua presença não tem efeitos tóxicos designam-se por anaeróbios aerotolerantes.

Para além destes podem ainda considerar-se outros grupos de microrganismos atendendo às suas necessidades em oxigénio, assim tem-se ainda os microaerofílicos que requerem oxigénio livre para o seu crescimento mas numa concentração muito baixa (2 a 10%).

A maioria dos microrganismos conhecidos encontra-se algures entre os dois extremos dos aeróbios estritos e dos anaeróbios aerotolerantes. São os anaeróbios facultativos que crescem tanto na presença como na ausência de oxigénio. Estes organismos respiram quando dispõem de oxigénio e fazem metabolismo fermentativo quando este se esgota. Atendendo a que obtém mais energia quando respiram estes organismos crescem mais depressa em condições aeróbicas do que em condições de anaerobiose.

Se um microrganismo anaeróbio facultativo for inoculado em meio de cultura apropriado e incubado, as células vão respirar até todo o oxigénio ser consumida a partir dessa altura o seu metabolismo passa a fermentativo, o seu crescimento continua mas mais lentamente. Esta situação acontece frequentemente em ambientes aquáticos onde se dá a deposição de detritos animais e vegetais e em processos de fermentação controlados para a obtenção de determinados alimentos e bebidas.

O conhecimento do modo como o oxigénio afecta o metabolismo de determinado microrganismo deve sugerir a melhor maneira de o estabelecer em cultura (fazer crescer) e de o classificar.

Para além de aceitador final na cadeia transportadora de electrões na respiração o oxigénio altera o potencial de oxidação - redução das células. Muitos sistemas enzimáticos das bactérias exigem condições extremamente reduzidas, ou seja um potencial de oxidação - redução baixo para que possam funcionar e vice-versa.

O tipo de crescimento microbiano ao longo de um tubo de ensaio reflecte a sua necessidade relativa de oxigénio. Os aeróbios estritos cresceram apenas à superfície do meio no tubo, os anaeróbios facultativos devem crescer ao longo de todo o tubo, os aerotolerantes anaeróbios cresceram também ao longo de todo o tubo mas provavelmente cresceram melhor junto ao fundo. O crescimento dos anaeróbios estritos depende de até que ponto o oxigénio se consegue difundir no meio de cultura e da sensibilidade das células em questão às formas tóxicas de



oxigénio. Anaeróbios que sejam muito sensíveis a ambientes que contenham oxigénio podem nunca conseguir crescer, mas outros crescerão desde o fundo até ao topo do tubo.

## **pH**

O pH constitui outro dos factores que influencia o crescimento microbiano. Cada espécie cresce numa gama definida de pH e tem um pH óptimo para o seu desenvolvimento. Os microrganismos acidófilos têm o seu óptimo de crescimento entre 0 e 5,5. Os neutrófilos entre 5,5 e 8 e os alcalófilos entre 8,5 e 11,5. Os alcalófilos extremos têm o seu óptimo de crescimento a valores de pH superiores a 10. De um modo geral cada tipo de microrganismos tem preferência por uma gama característica de pH. A maioria das bactérias e protozoários são neutrófilos. A maioria dos fungos prefere ambientes ligeiramente ácidos, entre pH 4 e 6. As algas também parecem preferir condições ligeiramente ácidas.

Embora os microrganismos, de um modo geral, possam crescer numa gama relativamente grande de pH existem limites para a sua tolerância. Variações drásticas no pH podem causar o rompimento da membrana celular ou inibir a actividade enzimática ou os transportadores membranares de proteínas.

Apesar das possíveis variações de pH no habitat, o pH interno da maioria dos microrganismos situa-se próximo da neutralidade (5 a 5,5). Vários mecanismos têm sido apontados como responsáveis por esta situação. A membrana plasmática pode ser relativamente impermeável aos protões. Os neutrófilos aparentemente trocam potássio por protões recorrendo a um sistema de transporte activo. Os alcalófilos extremos mantêm o seu pH interno próximo da neutralidade trocando iões sódio internos por protões externos. Para além disso existe uma certa capacidade tampão a nível interno que contribui para esta homeostasia do pH.

Os microrganismos frequentemente alteram o pH do seu habitat através da produção de produtos do seu metabolismo de carácter ácido ou básico, por esta razão são normalmente incluídos nos meios de cultura tampões cuja finalidade é evitar que os metabolitos excretados alterem o pH de tal forma que seja inibitório para o crescimento.

## **TEMPERATURA**

A temperatura constitui outro factor que influencia profundamente o crescimento microbiano, tal como acontece para todos os outros organismos. Os microrganismos são particularmente sensíveis à temperatura uma vez que são geralmente unicelulares e poiquilotérmicos (a sua temperatura varia com a temperatura externa). A temperatura influencia de forma decisiva o crescimento microbiano uma vez que interfere na velocidade das reacções enzimáticas. A taxa de cada reacção aumenta à medida que aumenta a temperatura, deste modo o metabolismo como um todo é mais activo a altas temperaturas e o microorganismo cresce mais depressa. A partir de determinados valores o crescimento acaba por ser menor, e temperaturas demasiado altas podem mesmo ser letais. Estas temperaturas provocam a desnaturação das enzimas, dos transportadores de membrana e outras proteínas. Temperaturas muito elevadas provocam a rotura das membranas celulares uma vez que a dupla camada lipídica se altera por acção do calor. Assim e embora em termos funcionais as enzimas operem mais rapidamente a temperaturas elevadas, o crescimento microbiano acaba por sofrer decréscimos na medida em que os estragos causados por estas temperaturas não podem ser reparados de forma adequada.

Definem-se 5 classes de microrganismos de acordo com a sua gama de temperatura de crescimento:

Classe	Temperatura (°C)
Psicrófilos	0 - 15
Psicrotróficos	0 - 35
Mesófilos	15 - 45
Termófilos	45 - 80
Hipertermófilos	65 - 110

Os psicrófilos crescem bem a 0°C e a sua temperatura óptima de crescimento situa-se nos 15°C ou abaixo disso. As membranas celulares destes microrganismos têm níveis elevados de ácidos gordos insaturados que permanecem num estado semi-fluido a baixas temperaturas e os seus sistemas enzimáticos, de transporte e síntese proteica estão adaptados a estas condições. A temperatura máxima que toleram é 20°C, a partir deste valor as membranas celulares sofrem disrupção e a célula perde o seu conteúdo. Estes microrganismos vivem nas zonas do Ártico e Antártico.

Os psicotróficos ou psicrófilos facultativos podem crescer a 0°C, embora a sua temperatura óptima de crescimento se situe entre os 20 e 30°C. A temperatura máxima que toleram é 35°C. Estes microrganismos, normalmente bactérias e fungos, são a principal causa de deterioração de alimentos refrigerados.

Os mesófilos têm uma temperatura óptima de crescimento entre 20 e 45°C e toleram temperaturas mínimas de 15 a 20°C e máximas de 45°C. A maioria dos microrganismos pertence a esta classe. Quase todos os agentes causadores de doenças no Homem são mesófilos.

Os termófilos podem crescer a temperaturas de 55°C ou superiores, o mínimo que toleram é 45°C e a sua temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 55 e 65°C. Na sua grande maioria são bactérias que proliferam em silagens, compostos ou linhas de água sobreaquecidas. Os seus sistemas enzimáticos e proteínas são mais estáveis que os dos mesófilos e os lípidos de membrana são mais saturados.

Os hipertermófilos têm a sua temperatura óptima de crescimento entre 80 e 110°C, normalmente não crescem bem a temperaturas inferiores a 65°C. Foram encontrados alguns microrganismos deste tipo a crescer a grandes profundidades no mar, em zonas muito quentes.

## PROCOLOS EXPERIMENTAIS

### P1 - MICROORGANISMOS NO MEIO AMBIENTE

#### Introdução

O nosso meio ambiente está repleto de microorganismos. Podemos encontrá-los no ar, na água, nos vários objectos e superfícies que nos circundam, etc. e é por isto que o trabalho em microbiologia deverá ser executado em condições de assepsia que impeçam a contaminação dos meios usados com microorganismos adventícios.

Este trabalho pretende ilustrar a ubiquidade dos microorganismos.

#### Material e Reagentes

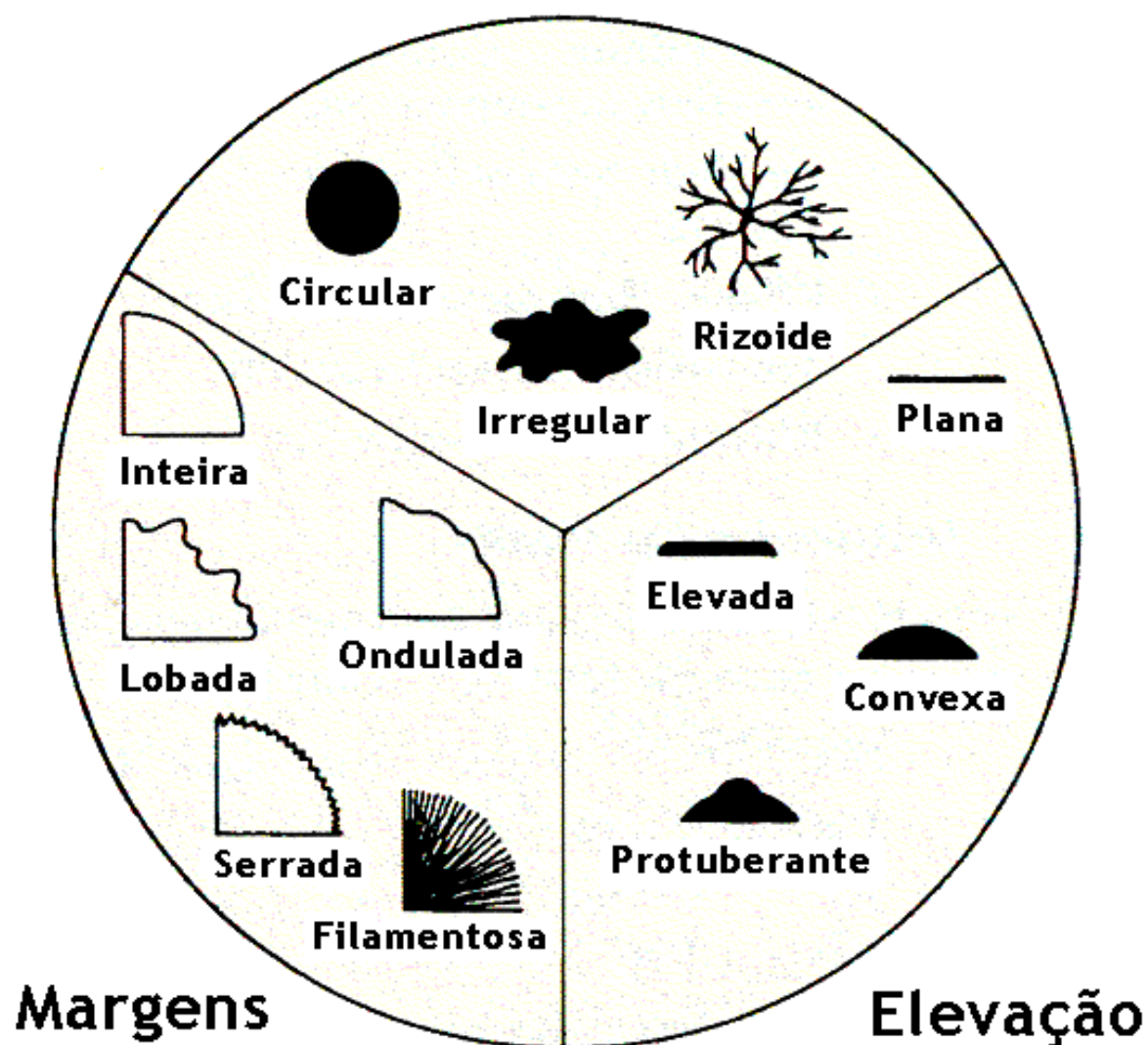
- Estufa de incubação
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Placas de Petri com meio de mosto

#### Procedimento experimental

Testar vários ambientes e objectos existentes no laboratório, usando placas de Petri contendo meio sólido nutritivo para a revelação dos microorganismos a detectar. Cada grupo deverá eleger um dos seguintes elementos a testar.

1. Identificar as placas, no fundo, com:
  - a. Data, Operador, Inócuo
2. Abrir uma placa sobre a bancada e deixá-la exposta durante cerca de 30 minutos
3. Tossir para a superfície do agar
4. Espalhar água da torneira sobre o agar. Aguardar alguns minutos. Remover o excesso com papel absorvente
5. Tocar com os dedos em vários locais da superfície do agar
6. Tirar um cabelo e "colá-lo" à superfície do agar
7. Use a imaginação para inocular outras placas
8. Incubar as placas de Petri em estufa a 25°C durante, pelo menos, uma noite
9. Observar as placas e registar
  - a. Número de colónias totais e Número de colónias diferentes
  - b. Aspecto geral da placa e das colónias
10. Descrever as características das colónias, acompanhando de esboços dos aspectos observados, relativamente a:
  - a. Superfície e bordos da colónia (lisa, rugosa, granular, irregular, filamentosa, etc.)
  - b. Característica ópticas (cor, transparência, brilho, etc.)
  - c. Consistência (membranar, butirosa, quebradiça, etc.)

# Formas



# Colónias em agar

Registo de resultados

MICROORGANISMOS NO MEIO AMBIENTE

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Inócuo: \_\_\_\_\_

Total de colónias: \_\_\_\_\_

<i>Caracterização das colónias observadas</i>					
Dimensão	Aspecto	Cor	Consistência	Número de colónias	Desenho

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P2 - OBSERVAÇÃO COMPARADA DE BACTÉRIAS, FUNGOS E PROTOZOÁRIOS**

### **Introdução**

Os microorganismos não são todos iguais embora partilhem a característica comum de na sua maioria serem individualmente invisíveis a olho nu, necessitando por isso de ampliação de forma a serem visualizados. Os microorganismos diferem entre si na sua organização celular, na sua aparência e na sua actividade. A dimensão celular só por si pode-nos auxiliar na constituição de diferentes grupos.

Podemos dividir os microorganismos em dois grandes grupos baseados no tipo de organização celular. Os microorganismos eucarióticos e os microorganismos procarióticos. Os microorganismos eucarióticos incluem três grandes grupos; os protozoários, as algas e os fungos. Estes últimos, os fungos, são divididos em dois subgrupos em função da sua organização multicelular ou unicelular, bolores e leveduras respectivamente. Os microorganismos procarióticos incluem as bactérias e as cianobactérias.

Protozoários. Considerados como simples "animais" unicelulares dada a complexidade das suas estruturas celulares. São conhecidas muitas espécies que colonizam ambientes aquáticos ricos em nutrientes tais como lagoas, mares e água do solo. A maioria é de vida livre e inofensivos para o homem apesar de algumas espécies serem patogénicas causando doenças tais como a malária e a doença do sono. São microorganismos eucarióticos possuindo um ou mais núcleos. Frequentemente móveis possuindo como meios de locomoção cílios, flagelos ou pseudópodes. As suas dimensões são variáveis podendo variar de alguns  $\mu\text{m}$  a vários mm.

Algas. Trata-se de um grupo de organismos que realizam a fotossíntese e que se disseminam por quase todos os ambientes aquáticos. Alguns destes microorganismos atingem grandes dimensões sendo macroscopicamente visíveis, no entanto a maioria são microscópicos. As algas microscópicas são normalmente organismos livres encontrados em locais onde água e luz estejam presentes. São normalmente visíveis como uma película verde à superfície de lagoas e aquários.

Fungos. Grupo muito diverso e largamente disseminado de microorganismos eucarióticos unicelulares e multicelulares (incluindo cenocíticos). Nos fungos podemos distinguir dois tipos; os bolores e as leveduras. Os bolores são normalmente organismos pluricelulares em que as células se organizam em estruturas tubulares semi-rígidas designadas por hifa. Uma massa de hifas toma a designação de micélio. De acordo com as espécies, as hifas podem ser de 3 tipos; não septadas (cenocíticas), septadas com células mononucleadas e septadas com células multinucleadas. O diâmetro de uma hifa varia de  $1 \mu\text{m}$  a dimensões visíveis a olho nu. Num micélio podemos encontrar hifas vegetativas e hifas férteis. Estas últimas albergam estruturas reprodutivas dos fungos (esporos), podendo ser do tipo sexuado ou assexuado. As leveduras são uma categoria de fungos normalmente caracterizada com base em aspectos morfológicos e fisiológicos. Organizam-se normalmente na forma unicelular podendo desenvolver estruturas alongadas resultantes de divisões celulares incompletas (pseudomicélio). Fermentam uma larga gama de açúcares e o seu modo de reprodução assexuada é, caracteristicamente, por gemulação. As suas dimensões são reduzidas (alguns  $\mu\text{m}$ ) sendo geralmente maiores que as bactérias.

Bactérias. Microorganismos procarióticos unicelulares muito diversificados e de distribuição ubiqüitária. Por possuírem parede celular rígida, possuem formas características designadas por bacilos (bacillus), cocos (coccus), espiraladas (spirillum) e vibrião (vibrio). As espécies de bactérias móveis possuem flagelos que podem estar inseridos na célula em diferentes localizações (polar, lofotrica e peritriquial) O seu processo de multiplicação é por fissão binária. As suas dimensões podem ser inferiores a  $1 \mu\text{m}$ , sendo na sua maioria entre  $1$  e  $10 \mu\text{m}$ .

Cianobactérias (algas verdes-azuis). Grupo heterogéneo de microorganismos procarióticos que realizam fotossíntese com produção de  $\text{O}_2$ , ao contrário do que acontece com as bactérias fotossintetizantes. Distinguem-se das microalgas pois não possuem cloroplastos bem como outros organelos característicos da célula eucariótica. Podem ser organismos unicelulares embora

existam muitas espécies caracteristicamente coloniais ou filamentosas. As suas dimensões são muito semelhantes às das bactérias.

### Material e Reagentes

- cultura de E. coli
- cultura de Rhizobium
- cultura de S. cerevisiae
- cultura de fungos
- suspensão de Leishmania
- Água de poça “orgânica”
- Solução salina estéril
- Lâminas e lamelas
- Microscópio e Lupa
- Azul metileno
- Infusão de palhas
- Ansas

### Procedimento experimental

1. Sobre uma lâmina de vidro coloque uma pequena gota de corante azul metileno diluído, sobre a qual coloca uma ansada do material que pretende observar, observando cuidados de assepsia.
2. Com o auxílio da ansa homogeneíze a suspensão obtida.
3. Cubra a suspensão com uma lamela, pressionando levemente.
4. Observe ao microscópio, aumentando progressivamente de ampliação. Quando usar a objectiva 100 x utilize óleo de imersão.
5. Para a observação de fungos filamentosos, não abra as placas de Petri, procedendo às observações através do vidro da placa usando a lupa.
6. Fazer esboços das células observadas, tendo em atenção a complexidade celular observável e a dimensão relativa dos espécimes.

Registo de resultados

OBSERVAÇÃO COMPARADA DE BACTÉRIAS, FUNGOS E PROTOZOÁRIOS

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Organismo</i>	<i>Esboço da morfologia predominante</i>	<i>Dimensão relativa</i>	<i>Comentário</i>
E. coli			
Rhizóbio			
S. cereviseae			
Leishmania			
Cultura de fungos			
Água de poça "orgânica"			
Infusão de palhas			

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---



### **P3 - MEIOS DE CULTURA**

#### **Introdução**

Quando no laboratório se pretende cultivar microorganismos é necessário fornecer-lhes as fontes de nutrientes (materiais plásticos e energéticos) indispensáveis ao seu crescimento. Os meios de cultura, para cumprir as suas funções terão de estar isentos de contaminantes susceptíveis de também crescer nas condições em que o microorganismo em teste se vai propagar.

Neste trabalho preparar-se-á um meio de cultura sólido e testar-se-á a capacidade do estudante para a sua preparação estéril.

#### **Material e Reagentes**

- |                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| – Autoclave                     | – Extracto de carne    |
| – Estufa de incubação           | – Peptona              |
| – Potenciómetro                 | – Agar                 |
| – Balão Erlenmeyer de 250 ml    | – 0,1N HCl e 0,1N NaOH |
| – Placas de Petri esterilizadas | – Água destilada       |

#### **Procedimento experimental**

1. Medir 200 ml de água destilada para o balão Erlenmeyer
2. Pesar os seguintes produtos:
3. Extracto de carne 0,75 gr
4. Peptona 1,25 gr
5. Adicionar ao balão e agitar até dissolução
6. Verificar e acertar a pH 7.2, se necessário, com as soluções de NaOH ou HCl
7. Adicionar água destilada ao volume final de 250 ml
8. Adicionar 3,75 gr de agar (1,5% final)
9. Homogeneizar por agitação (o agar não dissolve a frio)
10. Esterilizar o meio de cultura na autoclave a 121°C durante 15 minutos
11. Após a esterilização agitar o balão para homogeneizar o conteúdo
12. Deixe arrefecer até cerca de 45°C (quando o calor se começa a suportar na mão)
13. Distribuir esterilmente por placas de Petri (meia altura) evitando a formação de bolhas de ar
14. Deixar solidificar sobre a bancada (placas tapadas)
15. Incubar na estufa a 30°C durante 24 horas
16. Observar, registar e rejeitar as placas eventualmente contaminadas

Registo de resultados

MEIOS DE CULTURA

Operador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Número de placas preparadas (A): \_\_\_\_\_ Número de placas contaminadas (B): \_\_\_\_\_

Taxa de sucesso  
 $100 - (100 \times B / A)$ : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P4 - CULTURAS PURAS**

### **Introdução**

Um microorganismo, colocado num meio de cultura sólido adequado ao seu crescimento, multiplicar-se-á no local em que foi colocado, dado que o meio sólido não lhe permite movimentar-se livremente. Se num meio sólido os microorganismos forem colocados suficientemente afastados uns dos outros, cada um constituirá um núcleo de crescimento a partir do qual surgirá uma massa macroscopicamente visível - uma colónia.

Neste trabalho prático isolam-se culturas puras de bactérias usando o método do riscado e o método das placas de inclusão

### **Material e Reagentes**

- Estufa de incubação
- Banho Maria a 45°C
- Vortex
- Ansa
- Placas de Petri
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Tubos com agar nutritivo fundido
- Salino estéril

### **Procedimento experimental**

#### **Riscado**

1. Marcar uma placa de Petri contendo agar nutritivo (inócuo, operador, data, técnica do riscado)
2. Esterilizar a ansa na chama e arrefecer nas proximidades
3. Tomar uma porção de cultura com as bactérias a isolar
4. Espalhar o conteúdo da ansa na superfície do agar (escolha um dos métodos atrás descritos)
5. Repita o isolamento noutra placa usando uma técnica de riscado diferente
6. Incubar as placas, em posição invertida, na estufa a 30°C durante 24 horas
7. Observar as placas e registar a existência de colónias isoladas

#### **Placas de inclusão**

1. Marcar uma placa de Petri estéril (inócuo, operador e data)
2. Tomar um tubo com agar fundido do banho-maria
3. Adicionar uma ansada de cultura em estudo. Homogeneizar no vortex
4. Verter o conteúdo do tubo na placa de Petri cobrindo todo o fundo
5. Deixar solidificar sobre a bancada
6. Ressuspender uma ansada de cultura em 1 ml de solução salina estéril
7. Tomar uma ansada e repetir o processo para isolamento de colónias (passos 2 a 5)
8. Incubar as placas, em posição invertida, na estufa a 30°C durante 24 horas
9. Observar o crescimento bacteriano e registar a existência de colónias isoladas

Registo de resultados

CULTURAS PURAS

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Inócuo: \_\_\_\_\_

<i>Isolamento por riscado</i>			
Técnica exercitada	Aspecto geral da placa	Número de colónias isoladas	Percentagem da cultura em isolamento

<i>Isolamento por placas de inclusão</i>			
Quantidade de inócuo	Aspecto geral da placa	Número de colónias isoladas	Percentagem da cultura em isolamento

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---

## **P5 - COLORAÇÃO DE BACTÉRIAS. MORFOLOGIA E ASSOCIAÇÃO**

### **Introdução**

Para a observação microscópica de microorganismos é necessário diferenciar o seu conteúdo interno do meio exterior envolvente.

Neste trabalho observar-se-ão várias características de bactérias por observação ao microscópio de preparações submetidas a processos de coloração diversos. Pretende-se observar bactérias vivas e respectiva mobilidade, contrastadas por coloração do meio envolvente, discriminação entre microorganismos Gram positivos e Gram negativos e identificação do tipo de associação entre as células individuais.

### **Material e Reagentes**

- |                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| – Microscópio                      | – Azul-de-metileno                 |
| – Ansa                             | – Tinta-da-china                   |
| – Lâminas e lamelas de microscópio | – Reagentes para coloração de Gram |

### **Procedimento experimental**

#### *Preparação das lâminas*

1. Lavar as lâminas com sabão e com álcool para eliminar vestígios de gordura
2. Limpar com papel absorvente. Secar bem ao ar
3. Manipular as lâminas tocando apenas nos bordos

#### *Preparação de um esfregaço*

1. Identificar lâminas numa das extremidades
2. Tomar uma gota de cultura com uma ansa (a partir de meios líquidos)
3. Colocar a suspensão no centro da lâmina
  - a. Para meios sólidos tomar uma gota de salino no centro da lâmina e homogeneizar uma colónia de cultura com a ansa
4. Espalhar bem toda a suspensão bacteriana com movimentos circulares da ansa
5. Deixar secar completamente ao ar
6. Fixar a preparação "cortando" a chama 3 x com a lâmina (suspensão para cima)
7. Corar pelo método escolhido

#### *Coloração negativa (observação vital)*

1. Identificar lâminas numa das extremidades
2. Colocar uma gota de tinta-da-china no centro, a 2/3 do comprimento da lâmina
3. Adicionar uma gota de suspensão da bactéria (ou ansada com uma colónia)
4. Colocar lamela para observação vital
5. Observar ao microscópio de imediato
6. Registrar a mobilidade observada, se aplicável

### *Coloração negativa*

1. Preparar uma suspensão bacteriana em tinta-da-china (como atrás)
2. Tocar com a extremidade de outra lâmina na gota (posição inclinada)
3. Deslocar as duas lâminas arrastando a suspensão para formar uma fina camada
4. Deixar secar bem ao ar
5. Observar ao microscópio procurando uma zona da lâmina em que a observação seja possível
6. Registrar a forma das bactérias e o tipo de associação das células individuais

### *Coloração simples*

1. Colocar a lâmina com o esfregaço fixado sobre duas varetas na tina de lavagem
2. Colocar I ou II gotas de solução de azul-de-metileno (suficiente para cobrir o esfregaço)
3. Deixar actuar o corante durante 30 segundos a dois minutos
4. Passar a lâmina por várias "mudas" de água até não ser arrastado corante visível
5. Deixar secar ao ar
6. Observar ao microscópio e registar as observações

### *Coloração de Gram*

(respeitar rigorosamente os tempos indicados)

1. Colocar a lâmina com o esfregaço fixado sobre duas varetas na tina de lavagem
2. Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta. Deixar actuar durante 1 minuto
3. Eliminar rapidamente o corante com água corrente (jacto suave) - cerca de 5 segundos
4. Cobrir o esfregaço com solução de iodo. Deixar actuar durante 1 minuto
5. Eliminar rapidamente o iodo com água corrente (jacto suave) - cerca de 5 segundos
6. Descorar com álcool a 95° corrente até sair sem cor (10 - 20 segundos)
7. Lavar com água corrente (jacto suave) - cerca de 5 segundos
8. Cobrir o esfregaço com solução de safranina. Deixar actuar durante 30 segundos
9. Lavar com água corrente até não ser arrastado corante visível
10. Eliminar excesso de água com papel absorvente. Deixar secar ao ar
11. Observar ao microscópio
12. Registrar as observações:
  - a. Desenhar os diferentes tipos de bactérias observadas
  - b. Forma das bactérias
  - c. Tipo de associação
  - d. Propriedade Gram (positivo ou negativo)

Registo de resultados

COLORAÇÃO DE BACTÉRIAS. MORFOLOGIA E ASSOCIAÇÃO

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Coloração negativa</i>			
Amostra	Mobilidade	Forma / Associação	Desenho

<i>Coloração simples</i>			
Amostra	Forma	Associação	Desenho

<i>Coloração Gram</i>				
Amostra	Gram	Forma	Associação	Desenho

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---

## P6 - QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS

### Introdução

Os estudos em microbiologia obrigam com frequência à determinação do número de microorganismos num determinado inócuo, para caracterização da população presente numa certa amostra, ou para avaliação do crescimento do microorganismo em consideração.

Avaliar a concentração de microorganismos numa solução problema, fornecida para o efeito, constitui o objectivo deste trabalho. Utilizar-se-á a técnica de contagem por espalhamento de volume conhecido de diluição da amostra sobre a superfície de placas de agar nutritivo.

### Material e Reagentes

- Micropipetas, pontas e microtubos
- Pipetas pasteur ou espalhador
- Pipetas graduadas (1 ml)
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Estufa de incubação

### Procedimento experimental

1. A partir da amostra em estudo efectuar diluições decimais sequenciais, conforme ao esquema

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Amostra ( $10^0$ )	100 $\mu$ l	-	-	-	-	-
Diluição anterior	-	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Solvente	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l

2. Homogeneizando bem após cada diluição
3. Tomar 200  $\mu$ l da diluição  $10^{-4}$  e espalhar à superfície de uma placa de agar nutritivo até ao completo esgotamento do líquido, com auxílio de um espalhador ou de pipeta pasteur dobrada. Marcar a placa
4. Repetir o passo anterior com a diluição  $10^{-5}$
5. Repetir com a diluição  $10^{-6}$
6. Incubar em estufa a 37°C durante 48 horas, em posição invertida
7. Observar as placas e contar o número de colónias de cada placa
8. Determinar a concentração da amostra inicial ( $10^0$ )



Registo de resultados

QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Amostra: \_\_\_\_\_

<i>Contagens</i>			
Diluição	Volume inoculado	Número de colónias	Concentração (xx/ml)
10 <sup>0</sup>			
10 <sup>-1</sup>			
10 <sup>-2</sup>			
10 <sup>-3</sup>			
10 <sup>-4</sup>			
10 <sup>-5</sup>			
10 <sup>-6</sup>			

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P7 - CADEIA DE TRANSMISSÃO**

### **Introdução**

Os microorganismos, particularmente os patogénicos, podem ser dispersos na população susceptível por várias vias: por contacto directo, por gotas ou aerossóis ou por vectores, como os insectos. Uma via frequente de transmissão por contacto directo é mediada pelo "aperto de mãos" inadequadamente limpas.

Este exercício pretende documentar o contacto directo na transmissão de agentes infecciosos e a determinação do foco inicial de irradiação da infecção.

### **Problema**

Das várias bolas fornecidas, apenas uma estará "contaminada" com uma levedura não patogénica (*Saccharomyces cerevisiae*). Qual?

### **Material e Reagentes**

- Estufa de incubação
- Bola de algodão embebida
- Placas com meio de mosto
- Luvas

### **Procedimento experimental**

1. Atribuir um número a cada estudante e preencher a tabela durante a execução do trabalho
2. Calçar uma luva na mão direita
3. Dividir ao meio uma placa de meio de mosto e marcar cada lado com 2 e 3
4. Rolar a bola de algodão fornecida com os dedos da mão enluvada  
(a mesma bola para todos os elementos do mesmo grupo)
5. Cada elemento deverá "apertar a mão" a um colega de outro grupo
6. Repetir a ronda de "apertos de mão" com outro colega, diferente do anteriores
7. Inocular a placa de mosto, na zona 2, por contacto dos dedos da luva com a superfície do agar
8. Repetir a ronda de "apertos de mão" com outros colegas, diferentes dos anteriores
9. Inocular a placa de mosto, na zona 3, com idêntico procedimento
10. Incubar as placas de agar em estufa a 30°C durante 72 h.
11. Observar as placas e registar a presença de leveduras
12. Analisar os resultados e determinar a origem da infecção

Registo de resultados

CADEIA DE TRANSMISSÃO

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#	Nome	1º aperto de mão	2º aperto de mão	Cultura (s/n)	3º aperto de mão	Cultura (s/n)

Nome	#	1º aperto de mão	2º aperto de mão	Cultura (s/n)	3º aperto de mão	Cultura (s/n)
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					

Origem da infecção: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---

## **P8 - TESTE DO PAPEL HIGIÊNICO**

### **Introdução**

Neste trabalho pretende-se avaliar a eficácia do papel higiénico como barreira à contaminação com agentes bacterianos simulando uma situação corrente da sua utilização.

### **Material e reagentes**

- Papel higiénico
- Placas com meio MacKonkey
- Luvas de látex
- Copo com água e lixívia
- Toalha turca
- Sabonete
- Placa com crescimento de E. coli

### **Procedimento experimental**

1. Identificar convenientemente uma placa de Petri com meio MacKonkey
2. Traçar um risco que a divida ao meio e identificar uma das metades como “antes” e a outra como “depois”
3. Calçar uma luva e envolver um dedo em papel higiénico (1, 2, 3, 4 e 5 folhas, conforme o grupo)
4. Um ou dois elementos da turma executarão a experiência a partir do número 11
5. Passar com o dedo envolvidos no papel higiénico por uma superfície do crescimento de E. coli
6. Deitar o papel para o recipiente que contém água e lixívia
7. Voltando à placa com meio MacKonkey inocular o dedo na metade identificada como “antes”
8. Lavar a mão (com a luva) em água corrente e sabão e secar na toalha turca, como normalmente faz após o uso dos sanitários
9. Inocular agora o mesmo dedo da luva na metade da placa com meio de MacKonkey identificada como “depois”
10. Ainda com a luva calçada, passar as mãos por álcool e só depois retirar e rejeitar a luva
11. (Para os elementos que não executaram a experiência anterior):
12. Inocular um dedo de luva na metade “antes” da placa com meio MacKonkey
13. Lavar as mãos como em 8, usando o mesmo sabonete e toalha dos colegas
14. Inocular o mesmo dedo da luva na metade “depois” da placa com meio MacKonkey
15. Incubar as placas a 37°C durante uma semana
16. Observar o tipo e abundância de crescimento em cada uma das metades das placas de Petri inoculadas

Registo de Resultados

TESTE DO PAPEL HIGIÉNICO

Operador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Amostra	Aspecto do crescimento bacteriano	Observações
"antes"		
"depois"		

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## P9 - CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

### Introdução

Para além dos nutrientes para a síntese dos seus componentes vitais e da energia química necessária ao seu metabolismo, outras condições ambientais são necessárias para um adequado crescimento microbiano no laboratório.

Entre os parâmetros a controlar merecem especial destaque as concentrações relativas de oxigénio, os valores do pH no meio e a temperatura para o seu crescimento. Neste trabalho estudar-se-ão os efeitos de diferentes valores destes parâmetros no crescimento bacteriano.

### Material e Reagentes

- Estufas de incubação (20°C, 30°C e 37°C)
- Banho-maria
- Vortex
- Ansa
- Tubos esterilizados
- Meio de agar nutritivo semi-sólido
- Crescimentos de *E. coli*, *Rhizobium*, *S. cerevisiae*
- Meio de mosto líquido (pH 4, 7 e 9)
- Caldo nutritivo (pH 4, 7 e 9)

### Procedimento experimental

#### *Efeito do O<sub>2</sub>*

1. Tomar um tubo contendo agar nutritivo fundido (no banho-maria)
2. Inocular com a bactéria *E. coli*
3. Homogeneizar suavemente, mas de forma a espelhar a bactéria por todo o agar
4. Colocar o tubo na vertical e deixar solidificar à temperatura ambiente
5. Proceder do mesmo modo inoculando *Rhizobium* em outro tubo de agar
6. Incubar em estufa a 30°C durante 48 horas
7. Observar o crescimento e registar os resultados

#### *Efeito do pH e da temperatura*

(Marcar convenientemente todos os tubos a usar)

1. Inocular 1 tubo contendo meio de mosto a pH 4 com *S. cerevisiae*
2. Inocular 1 tubo contendo meio de mosto a pH 7 com *S. cerevisiae*
3. Inocular 1 tubo contendo meio de mosto a pH 9 com *S. cerevisiae*
4. Inocular 1 tubo contendo caldo nutritivo a pH 4 com *E. coli*
5. Inocular 1 tubo contendo caldo nutritivo a pH 7 com *E. coli*
6. Inocular 1 tubo contendo caldo nutritivo a pH 9 com *E. coli*
7. Homogeneizar bem todos os tubos
8. Incubar em estufa, durante 48 horas:  
Grupo A e D → 20°C    Grupo B e E → 30°C    Grupo C e F → 37°C
9. Observar o crescimento bacteriano nos diferentes tubos
10. Registar os resultados obtidos por todos os grupos da turma

Registo de resultados

CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

<i>Inócuo / Meio de cultura</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observações</i>
S. cerevisiae meio de mosto	4	20		
		30		
		37		
	7	20		
		30		
		37		
	9	20		
		30		
		37		
E. coli caldo nutritivo	4	20		
		30		
		37		
	7	20		
		30		
		37		
	9	20		
		30		
		37		

Registo de resultados

CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

<i>S. cerevisiae</i> (Meio de mosto)		<i>Temperatura</i>		
		20	30	37
pH	pH 4			
	pH 7			
	pH 9			

<i>E. coli</i> (Caldo nutritivo)		<i>Temperatura</i>		
		20	30	37
pH	pH 4			
	pH 7			
	pH 9			

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---



## **P10 - ANTIBIÓTICOS**

### **Introdução**

As espécies microbianas frequentemente inibem o crescimento umas das outras tanto pela excreção de produtos resultantes do seu metabolismo que alteram as condições ambientais, como pela produção de algumas substâncias químicas específicas: os antibióticos. Os antibióticos podem inibir o crescimento ou eliminar microorganismos com que contactem e, para poderem ser utilizados clinicamente, não deverão afectar significativamente os organismos eucarióticos nas doses terapêuticas.

Neste trabalho documentar-se-ão os efeitos de alguns antibióticos sobre algumas espécies bacterianas.

### **Material e Reagentes**

- |                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| – Cultura de E. coli        | – Solução salina estéril       |
| – Cultura de Rhizobium      | – Rolhão de algodão estéril    |
| – Cultura de Actinomices    | – Placas de agar nutritivo     |
| – Solução de Kanamicina     | – Discos de papel esterilizado |
| – Solução de Estreptomicina | – Pinça                        |
| – Solução de Spectinomicina | – Estufa de incubação          |

### **Procedimento experimental**

#### *Teste de susceptibilidade (Uma bactéria por grupo)*

1. Transferir 10 ml de solução salina estéril sobre placa com crescimento bacteriano
2. Suspender as bactérias com auxílio de rolhão de algodão estéril
3. Humedecer uniformemente a superfície do agar de uma placa nova com o rolhão de algodão
4. Deixar secar na estufa (~10 minutos)
5. Marcar a placa, dividindo em 4 partes
6. Mergulhar um disco de papel esterilizado em solução de antibiótico (um por antibiótico)
7. Escorrer excesso de solução
8. Colocar no centro do quadrante da placa de Petri marcada
9. Repetir passos 6 e 7 com solução salina estéril
10. Incubar na estufa até crescimento visível da bactéria:
  - a. E.coli a 37°C
  - b. Rizobium e Actinomices a 30°C
11. Observar inibição de crescimento ao redor dos discos de papel
12. Medir os círculos de inibição e registar os resultados

Registo de resultados

ANTIBIÓTICOS (teste de susceptibilidade)

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Antibiótico	[ x ] / ml	Diâmetro de inibição		
		<i>E. coli</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Actinomices</i>
Kanamicina				
Estreptomicina				
Espectinomicina				
Salino				

	Sensibilidade relativa aos antibióticos testados			Resistência
	Maior	Intermédia	Menor	
<i>E. coli</i>				
<i>Rhizobium</i>				
<i>Actinomices</i>				

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---

## **P11 - ANTI-SÉPTICOS E DESINFECTANTES**

### **Introdução**

Múltiplos reagentes químicos são diariamente utilizados para controlo da disseminação de microorganismos. Os produtos usados na "limpeza" de utensílios diversos, frequentemente demasiado tóxicos para ser usados directamente no Homem, são chamados de desinfectantes. Os produtos que aplicamos na pele, com o mesmo objectivo de eliminar eventuais microorganismos, são anti-sépticos. A promoção de artigos de higiene corporal e limpeza doméstica refere-se muitas vezes a propriedades antibacterianas desses produtos. Alguns serão bactericidas (matam ou inactivam as bactérias) outros serão bacteriostáticos (impedem o crescimento das bactérias, sem as inactivarem)

Neste exercício testar-se-á a capacidade antibacteriana de agentes anti-sépticos e desinfectantes de uso comum.

### **Material e Reagentes**

- Produto a testar
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Pinça
- Rolhão de algodão estéril
- Círculos de papel de filtro esterilizado

### **Procedimento experimental**

(Cada estudante deverá trazer de casa um pouco de pasta de dentes, sabonete, champô, detergente da louça ou outro produto que pretenda testar)

1. Recolher e marcar convenientemente as placas de Petri com agar nutritivo a usar
2. Preparar soluções ou suspensões dos materiais a testar
3. Esterilizar uma pinça, mergulhando em álcool e flamejando.  
ATENÇÃO AO ÁLCOOL NAS MÃOS e à proximidade do álcool da chama !!!
4. Usando técnica asséptica, mergulhar um rolhão de algodão esterilizado na cultura de bactérias
5. Inocular uma placa espalhando as bactérias contidas no algodão de forma uniforme na superfície do agar
6. Tomar um círculo de papel de filtro esterilizado e mergulhar na solução a testar, eliminando o excesso de líquido (com pinça estéril)
7. Depositar o círculo de papel sobre a superfície da placa inoculada, aconchegando com a pinça
8. Marcar convenientemente a posição na placa e a amostra a testar
9. Repetir com outros materiais, no máximo de 6 por placa de Petri
10. Incubar a 30°C durante 48 horas
11. Observar os crescimentos bacterianos
12. Registar os resultados medindo o diâmetro de inibição de crescimento bacteriano à volta dos filtros
13. Comparar a efectividade antibacteriana de cada material testado (ter em conta a diluição inicial e o uso recomendado do produto)

Registo de resultados

ANTI-SÉPTICOS E DESINFECTANTES

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

<i>Produto</i>	<i>Diluição</i>	<i>Diâmetro de inibição</i>	<i>Efectividade antibacteriana</i>	<i>Observações</i>

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P12 - MICROBIOLOGIA DAS ÁGUAS**

### **Introdução**

A presença de microorganismos em todos os ambientes susceptíveis de suportar a vida é um dado já adquirido. A água, como suporte da vida terrestre, é um bem fundamental de utilização generalizada em que o nível e o tipo de microorganismos que a contaminem são da maior relevância para as suas utilizações. São múltiplos os testes que têm sido desenvolvidos para avaliação da qualidade bacteriológica da água com vista a prevenir a transmissão de doenças infecciosas pelo seu consumo.

Dado que os agentes patogénicos para o Homem, eventualmente presentes na água, existem aqui em quantidades muito pequenas, a sua detecção por amostragem é muito falível. Recorre-se então à pesquisa de organismos indicadores que possam reflectir os níveis de contaminação fecal da água. Dependendo dos usos a que a água se destina, assim são definidos os níveis máximos de coliformes permitidos por unidade de volume.

Neste exercício laboratorial avaliar-se-á a qualidade microbiológica de uma água pela detecção de eventuais coliformes presentes e pela determinação do número mais provável de microorganismos.

### **Material e Reagentes**

- 9 tubos de caldo de lactose 2X (dupla concentração e tubo de Durham)
  - 10 ml cada
- pipetas estéreis
- estufa de incubação 37°C
- Sistema para filtração estéril
- Filtros esterilizantes
- Sistema de filtração estéril
- Meio ENDO (sólido)
- Amostra de água

### **Procedimento experimental**

#### *Determinação NMP (Número Mais Provável)*

1. Marcar e identificar os tubos com caldo de lactose:
  - a. 3 tubos: #0,1
  - b. 3 tubos: #1
  - c. 3 tubos: #10
2. Adicionar a cada tubo #10 um volume de 10 ml de água a testar
3. Adicionar a cada tubo #1 um volume de 1 ml de água a testar+9 ml água estéril
4. Adicionar a cada tubo #0.1 um volume de 0.1 ml de água a testar + 10 ml água estéril
5. Incubar em estufa a 37°C.
6. Observar a formação de gás nos tubos de Durham entre as 24 e as 48 horas seguintes.
7. Registrar o número de tubos positivos.
8. Determinar o NMP/100 ml usando a tabela de NMP.

### Filtração por membrana

1. Montar assepticamente a membrana no sistema de filtração
2. Ligar a fonte de vácuo
3. Filtrar a água a analisar (50 ml, 100 ml, 200 ml)
4. Transferir o filtro para meio sólido (ENDO) em placa
5. Incubar em estufa a 37°C durante 24 horas
6. Observar, registar os resultados
7. Contar as colónias avermelhadas com superfície de aspecto metalizado
8. Calcular o número de coliformes por 100 ml

### Tabela NMP

TABELA NMP							
(3 x 10ml + 3 X 1 ml + 3 X 0,1 ml)							
Número de tubos positivos			Índice NMP / 100 ml	Número de tubos positivos			Índice NMP / 100 ml
#10	#1	#0.1		#10	#1	#0.1	
0	0	0	< 3	3	0	0	23
0	0	1	3	3	0	1	39
0	1	0	3	3	0	2	64
1	0	0	4	3	1	0	43
1	0	1	7	3	1	1	75
1	1	0	7	3	1	2	120
1	1	1	11	3	2	0	93
1	2	0	11	3	2	1	150
2	0	0	9	3	2	2	210
2	0	1	14	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	2	0	21	3	3	3	> 2 400
2	2	4	28				

Registo de resultados

MICROBIOLOGIA DAS ÁGUAS

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Amostra de água: \_\_\_\_\_

*NMP*

Tubos	Positivos	Negativos	NMP / 100 ml
# 10			
# 1			
# 0,1			

*Filtração por membrana*

Volume filtrado	Número de coliformes

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P13 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE**

### **Introdução**

O leite é dos alimentos mais ricos e completos e, por isso, dos mais susceptíveis a contaminações microbianas. O leite animal utilizado no consumo público tem de ser submetido a diversos processos para diminuição da carga bacteriana tanto normal como adventícia, resultante das práticas zootécnicas da sua recolha. Para garantia da segurança alimentar importa verificar o estado microbiológico do leite.

Neste trabalho executar-se-ão algumas técnicas simples para demonstração do estado de contaminação bacteriana de leites crus (não tratados) e de leites pasteurizados.

### **Material e Reagentes**

- |                               |   |                                      |
|-------------------------------|---|--------------------------------------|
| – Banho-maria                 | – Leite cru                             | – Tubos com agar nutritivo (fundido) |
| – Estufa de incubação (37°C)  | – Leite UHT                             | – Placas de Petri esterilizadas      |
| – Azul-de-metileno (1:25.000) | – Tubos com 5 ml de caldo de lactose 2X | – Tubos de ensaio estéreis           |

### **Procedimento experimental**

#### *Teste da reductase*

1. Transferir 10 ml de cada leite por tubo de ensaio
  - a. (2 por amostra)
2. Adicionar 1 ml de azul de metileno (1:25.000) a cada tubo
3. Tapar com parafilm. Homogeneizar por inversão duas vezes
4. Aquecer um tubo de cada leite em banho-maria fervente durante 3 minutos (controlos)
5. Incubar na estufa a 37°C, durante 5 minutos
6. Homogeneizar de novo por inversão
7. Incubar na estufa a 37°C, sem agitar
8. Observar a alteração da coloração por comparação de cada tipo de leite aos tempos indicados
9. Registar as observações (viragem a 4/5 do volume)

#### **Interpretação:**

Classe 1: Excelente - não descora até às 8 horas

Classe 2: Bom - descora em menos de 8 horas

Classe 3: Razoável - descora em menos de 6 horas

Classe 4: Mau - descora em menos de 2 horas



*Contagem de microorganismos*

1. Diluir cada tipo de leite a  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  (volume final de 10 ml)
2. Leite cru:
  - a. Inocular 5 ml de cada diluição em 5 ml de caldo de lactose 2X
3. Leite UHT:
  - a. Incorporar 0,1 ml de cada diluição em agar nutritivo
4. Incubar em estufa a 37°C durante 48 horas
5. Observar a produção de gás nos tubos de Durham às 24 e 48 horas
6. Observar crescimento bacteriano nas placas e contar colónias às 24 horas
7. Registrar as observações

Registo de resultados

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE UM LEITE

Teste da reductase

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Tempos</i>	<i>Cru</i>	<i>UHT</i>
0:15		
0:30		
0:45		
1:00		
1:30		
2:00		

<i>Tempos</i>	<i>Cru</i>	<i>UHT</i>
3:00		
4:00		
5:00		
6:00		
7:00		
8:00		

<i>Qualidade do leite</i>	
<i>Cru</i>	<i>UHT</i>

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---

Registo de resultados

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE UM LEITE

Contagem de microorganismos

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Leite Cru (caldo de lactose)</i>			
	24 H	48 H	Observações
10 <sup>-2</sup>			
10 <sup>-3</sup>			
10 <sup>-4</sup>			
10 <sup>-5</sup>			

<i>Leite UHT (agar nutritivo)</i>			
	<i>Número de colónias</i>	<i>Bactérias / ml</i>	<i>Observações</i>
10 <sup>-2</sup>			
10 <sup>-3</sup>			
10 <sup>-4</sup>			
10 <sup>-5</sup>			

\_\_\_\_\_

Notas:

---



---



---



---



---



---



---



---

## P14 - PREPARAÇÃO DE UM IOGURTE

### Introdução

A fermentação microbiana é desde há séculos usada como meio de preparação e preservação de certos alimentos. O iogurte, o vinho, os pickles, certos molhos de soja, o sauerkraut são apenas alguns exemplos de produtos de fermentação microbiana. As alterações químicas que ocorrem durante a fermentação permitem a preservação dos alimentos e fazem com que as características organolépticas do produto final, nomeadamente o sabor e o aroma, assumam um carácter atractivo para o consumidor. Para além disso, particularmente no caso do iogurte, a ingestão de grandes quantidades de bactéria ácido-lácticas que estes produtos contêm parece ter efeitos benéficos para a saúde humana.

As bactérias responsáveis por algumas fermentações, como é o caso do sauerkraut ou dos pickles, fazem normalmente parte da flora nativa dos vegetais. As condições de crescimento favoráveis à fermentação proporcionam a proliferação dos microorganismos desejados. Já para a produção de outro tipo de alimentos fermentados, tal como o iogurte, normalmente adiciona-se uma *starter culture* para iniciar a fermentação. Esta *starter culture* contém um número elevado de microorganismos específicos necessários à fermentação desejada para que resulte um produto final de alta qualidade.

A fermentação do leite para a obtenção de iogurte é principalmente levada a cabo por bactérias ácido-lácticas, nomeadamente estreptococos e lactobacilos. A produção de ácido láctico a partir do açúcar do leite (lactose) feita por estas bactérias resulta na coagulação das proteínas do leite formando-aquilo a que vulgarmente se chama uma coalhada.

### Material e Reagentes

- |  |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| – Iogurte fresco<br>(ou <i>starter culture</i> ) | – Recipiente de plástico | – Copo de vidro          |
| – Leite fresco magro                             | – Placa de aquecimento   | – Lâminas de microscópio |
| – Leite em pó                                    | – Potenciómetro          | – Corantes de Gram       |
|  | – Termómetro             |                          |

### Procedimento experimental

1. Colocar 100 ml de leite fresco magro num copo de vidro de 250 ml.
2. Medir e registar o pH.
3. Aquecer o leite a 85°C durante 15 minutos. Durante este período agitar suavemente o leite e controlar a temperatura com o termómetro colocado dentro do copo.
4. Passados os 15 minutos adicionar 3 g de leite em pó e agitar para dissolver.
5. Arrefecer a mistura até 40 a 42°C e adicionar a *starter culture* ou duas colheres de chá de iogurte fresco por cada 100 ml de leite.
6. Verter o conteúdo do copo para um recipiente de plástico, cobrir com papel de alumínio e incubar a 40 ou 42°C de 18 a 24 horas.
7. No final do período de incubação verificar o pH do produto (iogurte) e observar o seu aspecto, particularmente a consistência o sabor e o aroma.
8. Preparar um esfregaço da *starter culture* ou do iogurte fresco usado na inoculação e do produto obtido e corar para observação do Gram.

Registo de Resultados

PREPARAÇÃO DE UM IOGURTE

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Observação / Determinação</i>	<i>Valor / Registo</i>	<i>Notas</i>
pH do leite		
Gram do iogurte fresco (ou starter culture)		
Aspecto do produto obtido		
Sabor do produto obtido		
Aroma do produto obtido		
pH do produto obtido		
Gram do produto obtido		

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **P15 - ISOLAMENTO DE RHIZOBIUM.**

### **OBSERVAÇÃO DE NÓDULOS E BACTEROIDES**

#### *Introdução*

A presença de nódulos na raiz levou os investigadores a atribuir desde muito cedo a responsabilidade destas estruturas na fixação de N<sub>2</sub>. No entanto, apenas em 1888 BEIJERINCK provou experimentalmente que os nódulos contêm bactérias sendo estas responsáveis pela fixação do azoto atmosférico. Para tal terá certamente utilizado a metodologia recentemente desenvolvida por ROBERT KOCH no estabelecimento das relações causa-efeito determinadas pela acção de micróbios. Segundo esta metodologia, a identificação de um microrganismo como responsável por uma determinada sintomatologia, implica o seu isolamento em cultura pura, bem como a reprodução daquela em condições experimentalmente definidas - POSTULADOS DE KOCH.

Este trabalho prático consiste na tentativa de demonstração de que a bactéria com as características a seguir descritas é a responsável pela formação de nódulos e fixação de azoto em hospedeiros compatíveis.

#### *Características*

Células em forma de bastonete curto, Gram -, com dimensões que variam entre 0,5 e 0,9 µm por 1,2 a 3,0 µm, ocorrendo isolados ou aos pares, móveis por flagelos polares, subpolares ou peritriquiiais, não formam esporos e em culturas envelhecidas apresentam granulações de poli-β-hidroxibutirato. Apresentam bom crescimento em meio de Manitol Levedura, podendo em meios gelificados desenvolver colónias planas, convexas ou umbilicadas. Estas são normalmente brancas e opacas, por vezes translúcidas, apresentando frequentemente produção de goma de natureza polissacarídica. A inclusão de vermelho do Congo no meio de cultura não conduz a uma forte absorção deste corante pelas colónias, podendo certas estirpes apresentar ligeira absorção. As estirpes de crescimento rápido produzem colónias de 4 a 6 mm de diâmetro em 5 dias de incubação a 26-30°C provocando acidificação do meio de cultura. As estirpes de crescimento lento produzem colónias com 1 mm de diâmetro em 10 dias de incubação a 28-30°C, provocando a alcalinização do meio de cultura. Induzem a formação de nódulos na raiz de leguminosas compatíveis, colonizando-os e podendo aí desenvolver actividade diazotrófica em simbiose. No interior dos nódulos podem sofrer pleomorfismos apresentando células de formas muito variadas.

## 1ª Sessão

### *Objectivo*

Observação de nódulos e bacteroídes.

Início do isolamento em cultura pura.

### Material necessário

#### *Biológico*

- Raízes de leguminosas noduladas; trevos, luzernas, vicias e serradelas recolhidas no campo.

#### *Químico*

- Solução de etanol 90%
- Solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3-5%
- Solução de NaCl a 0,85% (Salina)
- Solução de Safranina
- Meio de Agar Manitol Levedura (AML) com Vermelho do Congo
- Meio de Agar Manitol Levedura (AML) com Cyclohexamida
- Óleo de imersão para microscopia óptica
- Xilol

#### *Diverso*

- Pinças de ponta fina, Tesouras, Bisturis, Varetas de vidro
- Caixas de Petri esterilizadas
- Bico de Bunsen ou lamparinas de álcool
- Lâminas de vidro para microscopia
- Microscópio óptico
- Ansas de cromoníquel
- Pipetas de Pasteur esterilizadas
- Papel de filtro
- Copos de vidro de 250 ml
- Balões Erlenmeyer de 250 ml, esterilizados
- Estufas de incubação
- Fósforos
- Caixa para guardar preparações.

### Procedimento

#### *Observação da nodulação em diferentes leguminosas*

Identifique as leguminosas que encontra sobre a sua bancada de trabalho. Corte a parte aérea das plantas e coloque as raízes num copo de vidro, utilizando um copo para cada género de leguminosa. Lave vigorosamente as raízes em água corrente de modo a remover toda a terra e outras impurezas. Retire uma raiz de cada copo e coloque-as sobre folhas de papel de filtro. Distenda a raiz, separando bem as raízes secundárias, deixando a raiz principal numa posição central. Observe e anote o número de nódulos na raiz principal e raízes secundárias, a sua distribuição ao longo da raiz e as suas dimensões. Observe a coloração exterior dos nódulos e após seccionar com bisturi alguns nódulos, observe a coloração interior do tecido nodular. Compare a forma dos nódulos nas diferentes leguminosas.

#### *Observação de bacteroídes*

Escolha uma raiz de vicia e uma raiz de trevo bem noduladas e destaque um nódulo proeminente localizado na raiz principal de cada uma delas, colocando-a sobre uma gota de solução salina no fundo de uma caixa de Petri. Com uma vareta de vidro proceda ao esmagamento do nódulo de forma a obter um macerado. Coloque uma gota de solução salina sobre uma lâmina de microscopia e transfira uma ansada do macerado obtido para a gota de solução salina, homogeneize e proceda ao espalhamento da suspensão de modo a obter um esfregaço. Faça a

coloração da preparação com solução de safranina durante 5 minutos. Remova o excesso de corante, lave a preparação com água e deixe secar. Observe ao microscópio utilizando objectiva de ampliação 100x, com óleo de imersão. Após observação de bacteróides, limpe a objectiva com xilol e identifique as preparações com data, espécime e grupo de trabalho, guardando-as em caixa distribuída para o efeito.

#### *Isolamento de Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*

De uma das raízes de trevo retire alguns nódulos da raiz principal, com o cuidado de deixar cerca de 1-2 mm de raiz para cada um dos lados do nódulo. Coloque-os numa caixa de Petri com solução etanol 90% durante 30 segundos, transferindo-os de seguida para outra caixa de Petri contendo solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3-5%, deixando actuar durante 4-5 minutos. Seguidamente transfira assepticamente os nódulos para uma caixa de Petri com água destilada esterilizada. Depois de uma passagem pela água destilada, transfira os nódulos para o fundo de uma caixa de Petri, colocando cada um sobre uma gota de solução salina. Com vareta de vidro esterilizada, proceda ao esmagamento dos nódulos de forma a obter um macerado tão uniforme quanto possível. Com este macerado inocule placas MLA com Vermelho do Congo e Cyclohexamida\*.

Proceda à inoculação de placas por riscado, com flambagem da ansa entre cada série de riscos, de forma a obter colónias individualizadas após a incubação. Inocule 2 caixas de Petri por cada nódulo. Após a inoculação inverta as placas e coloque-as na estufa de incubação à temperatura de 28°C. Lave e arrume a bancada de trabalho.



## 2ª Sessão

### *Objectivo*

Familiarização com as características coloniais e morfologia celular de *Rhizobium*, repicagem de colónias para obtenção de culturas "puras" e observação diferencial de bactérias e bacteróides.

### Material necessário

#### *Biológico*

- Colónias obtidas pelos crescimentos resultantes das inoculações realizadas na sessão anterior
- Bacteróides em esfregaços corados

#### *Diverso*

- Lâminas de vidro para microscopia
- Ansas de cromoníquel
- Caixas de Petri
- Pipetas de Pasteur
- Microscópio óptico
- Bico de Bunsen ou lamparina de álcool
- Esguicho para água
- Peras de borracha
- Estufas de incubação

#### *Químico*

- Corantes para coloração de Gram
- Solução de Cristal Violeta
- Solução de Iodo
- Álcool Iodado
- Solução de Safranina
- Solução de NaCl a 0,85% (salina)
- Óleo de imersão para microscopia óptica
- Xilol
- Meio de Agar Manitol Levedura (AML) com e sem Azul de Bromotimol
- Meio de Agar Peptona Glucose com Vermelho Neutro
- Solução de etanol 90%

### Procedimento

*Caracterização da morfologia colonial, morfologia celular e reacção de Gram de isolamentos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii**

Retire da estufa de incubação as placas inoculadas na sessão anterior. Observe os crescimentos obtidos e tente encontrar colónias perfeitamente individualizadas. Com o auxílio da bibliografia fornecida, procure identificar colónias com as características descritas para o género *Rhizobium*. Atenda essencialmente à dimensão, forma, textura, elevação e pigmentação das colónias. Dê especial atenção ao grau de absorção do corante utilizado no meio de cultura. Escolha algumas colónias individualizadas com características que mais se assemelhem com as descritas para a bactéria em estudo e proceda à sua descrição. Com o auxílio de uma ansa flambada, transfira uma pequena porção de cada uma das colónias para gotas de solução salina sobre lâmina de microscopia. Homogeneíze e espalhe sobre a lâmina a suspensão assim obtida. Elabore esfregaços seguindo o protocolo habitual e proceda à coloração de Gram sobre tais esfregaços. Observe as preparações ao microscópio com objectiva de 100x e óleo de imersão. Verifique a morfologia celular, a reacção aos corantes e a presença de contaminantes Gram positivos. Compare a morfologia celular encontrada nestes esfregaços com a obtida nos esfregaços realizados na sessão anterior. Identifique e guarde todas as preparações coradas.

### *Inoculação de meios para a sessão seguinte*

Proceda à repicagem de colónias que, e após observação ao microscópio, não apresentem contaminantes e cuja morfologia celular esteja de acordo com a descrita para o género, inoculando meio AML com Azul de Bromotimol<sup>1</sup>, Agar de Peptona Glucose com Vermelho Neutro e MLA sem corante. Neste último meio faça um riscado que permita um crescimento em massa, o que poderá obter se não esterilizar a ponta da ansa entre cada série de riscos. Lave e arrume a bancada de trabalho.

---

<sup>1</sup> - A incorporação de Azul de Bromotimol permite verificar a natureza ácida ou alcalina dos metabólitos resultantes da utilização da fonte de energia do meio de cultura. A inoculação de Meio de Agar Peptona Glucose com Vermelho Neutro, pretende despistar contaminantes, dado que o rizóbio não cresce neste meio de cultura.

### 3ª Sessão

#### *Objectivo*

Realização do ensaio gnotobiótico para verificação dos "Postulados de Koch" e avaliação de isolamentos.

#### Material necessário

##### *Biológico*

- Crescimentos resultantes das inoculações realizadas na sessão anterior
- Radículas de *Trifolium subterraneum* cv. Mount Barker

##### *Químico*

- Solução de NaCl a 0,85%
- Solução nutritiva de Jensen com e sem azoto combinado
- Solução de etanol 90%
- Solução de HgCl<sub>2</sub> a 0,1%, acidificado com HCl puro 5ml/l
- Agar de água 0,8%
- Água destilada esterilizada

##### *Diverso*

- Balões Erlenmeyer de 150 ml, esterilizados
- Frascos sorológicos de 25 ml, esterilizados
- Areia esterilizada
- Tubos de ensaio com tampa de rosca, esterilizados
- Pipetas volumétricas de 5 ml, escoamento total, esterilizadas
- Caixas de Petri, esterilizadas
- Sacos de polietileno 8x12 cm
- Elásticos
- Câmara climatizada

#### Procedimento

Nesta 3ª sessão procede-se à inoculação de plântulas de trevo subterrâneo, obtidas por germinação asséptica de sementes desinfectadas. Não sendo exequível, por questões essencialmente de tempo, a obtenção pelos alunos de tais plântulas, procede-se à demonstração da desinfecção e embebição de sementes para rápida germinação ( $\pm$  24 horas), sendo acompanhada com comentários sobre a técnica utilizada. Os alunos encontram, assim, na bancada de trabalho caixas de Petri com sementes germinadas assepticamente sobre agar de água, com cerca de 1 cm de radícula e prontas a serem transferidas. Também os frascos com areia e solução nutritiva estão já previamente preparados e esterilizados.

#### *Preparação de suspensões e inoculação de plântulas*

Observe os crescimentos obtidos nos diferentes meios de cultura inoculados na sessão anterior, e baseando-se no resultado dessa observação escolha uma das placas MLA inoculada para crescimento em massa e junte cerca de 20 ml de solução salina no interior da caixa de Petri. Com o auxílio da ponta de uma pipeta esterilizada, procure suspender a massa de células que se encontra sobre o agar, de modo a obter uma suspensão densa. Transfira a suspensão por pipetagem para um balão Erlenmeyer 150 ml esterilizado e homogeneíze a suspensão recorrendo ao enchimento e esvaziamento vigoroso da pipeta para o interior do balão. Repita várias vezes este procedimento. Com uma ansa esterilizada e arrefecida, transfira plântulas para frascos de areia com solução nutritiva. Quando terminar a transferência de plântulas inocule 10 frascos com 1 ml da suspensão anteriormente obtida. Procura manter cuidados de assépsia em toda a execução do trabalho. Elabore tratamentos testemunha não inoculados, com utilização de solução nutritiva de Jensen com e sem azoto combinado e em número idêntico ao dos inoculados. Identifique claramente todos os frascos com data, espécime, tratamento e grupo de

trabalho. Cubra os frascos com sacos de polietileno, fixando a boca do saco contra o frasco utilizando um elástico. Coloque todos os frascos no interior da câmara climatizada, procurando que a sua distribuição seja feita ao acaso. Programe as condições de temperatura e fotoperíodo nas quais pretende o desenvolvimento das plantas. Inocule tubos com meio MLA com os isolamentos utilizados na inoculação de plântulas. Lave e arrume a bancada de trabalho.

#### 4ª Sessão

Esta tem lugar 6 semanas após a 3ª sessão

#### Objectivo

Confirmação de isolamentos e avaliação da efectividade simbiótica.

#### Material necessário

##### *Biológico*

– Plantas de trevo subterrâneo preparadas na 3ª sessão desta Unidade Pedagógica

##### *Químico*

– Idêntico ao da 1ª sessão

##### *Diverso*

– Idêntico ao da 1ª sessão  
– Folhas de papel de alumínio  
– Alfinetes ou fios de cromoníquel  
– Estufa ventilada

#### Procedimento

##### *Avaliação da efectividade simbiótica*

Retire as plantas da câmara climatizada e remova os sacos de polietileno. Separe as plantas pelos tratamentos realizados ( inoculados, não inoculados sem azoto combinado e não inoculados com azoto combinado) e compare o desenvolvimento das plantas nos 3 tratamentos. Proceda à remoção da parte aérea das plantas, cortando-a junto ao colo. Com papel absorvente retire as gotas de água que eventualmente se encontrem sobre folhas e caules. Coloque cada uma das plantas recolhidas (só parte aérea) sobre um pedaço de folha de alumínio, dobre com cuidado e abra pequenos orifícios para circulação de ar. Coloque as plantas assim acondicionadas na estufa ventilada a 65°C. Identifique claramente o material colocado na estufa.

##### *Confirmação de isolamentos como *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii**

Em água corrente remova a areia dos frascos sorológicos, retirando as raízes com todo o cuidado. Proceda à remoção de todas as partículas de areia tentando não as confundir com nódulos. Verifique a presença ou ausência de nódulos em todas as raízes, quer inoculadas quer não inoculadas. Escolha alguns dos nódulos obtidos, proceda ao seu esmagamento e com os macerados resultantes, inocule meio MLA, procedendo de forma idêntica ao trabalho realizado na 1ª sessão. Lave e arrume a bancada de trabalho.

## 5ª Sessão

### *Objectivo*

continuação do trabalho da sessão anterior

### Material necessário

#### *Biológico*

- Crescimentos resultantes das inoculações realizadas na sessão anterior
- Parte aérea das plantas recolhidas na sessão anterior
- Esfregaços corados e guardados desde a 2ª sessão.

#### *Diverso*

- Idêntico ao da 1ª sessão
- Balança analítica
- Exsicadores

#### *Químico*

- Idêntico ao da 1ª sessão

### Procedimento

#### *Avaliação da efectividade simbiótica*

Munindo-se de uma pinça, retire da estufa ventilada os pequenos embrulhos contendo a parte aérea das plantas utilizadas no ensaio, colocando-as rapidamente no exsicador, não mantendo este aberto mais tempo que o necessário. Dirija-se para a bancada onde se encontra a balança analítica e proceda à pesagem de cada um dos pequenos embrulhos, respeitando os procedimentos relativos à abertura e fecho do exsicador. A medida que são efectuadas as pesagens um outro colega de grupo retira o conteúdo dos pequenos embrulhos, limpa os envólucros colocando-os novamente dentro do exsicador. Quando terminarem as pesagens dos embrulhos, iniciam-se as pesagens dos envólucros. Tome nota dos valores das pesagens e determine o peso seco da parte aérea das plantas utilizadas no ensaio.

#### *Confirmação de isolamentos como *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii**

Retire as placas de Petri com meio AML inoculadas na sessão anterior e compare as características do crescimento colonial com as mesmas que anotou na 2ª e 3ª sessões. A partir de colónias isoladas elabore esfregaços e faça a coloração de Gram, comparando ao microscópio as preparações agora obtidas com as da segunda sessão.

## **P16 - BACTERIÓFAGO DE E. COLI**

### **Introdução**

Todos os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e são incapazes de se propagar em meios nutritivos como acontece com grande número de bactérias e outras células. Cada tipo de vírus requer um hospedeiro adequado para se replicar. Há vírus que conseguem infectar diferentes tipos de hospedeiros e outros de maior especificidade para um tipo particular de células.

No caso dos bacteriófagos (= "comedores de bactérias"), os hospedeiros nos quais se podem multiplicar são bactérias.

Neste trabalho isolar-se-ão bacteriófagos de E. coli em placas de lise.

### **Material e reagentes**

- Suspensão de bacteriófago lítico de E. coli ( $\lambda$ -DASH)
- Suspensão de cultura recente de E. coli (P2)
- Meio de cultura NZY
  - NaCl ----- 5 g
  - MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O----- 2 g
  - Yeast extract ----- 5 g
  - N7 amine (casein hydrolysate)-- 10 g
  - H<sub>2</sub>O -----ad 1000 ml
- Agar NZY (NZY contendo 1,5% de Bacto Agar)
- TOP NZY (NZY contendo 0,7% de agarose)
- Solução salina estéril
- MgSO<sub>4</sub> 10mM
- Pipetas pasteur
- Microtubos esterilizados
- Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas

### **Procedimento (por grupo)**

#### *Preparação das bactérias:*

1. Tomar 10 ml de meio de cultura líquido NZY adicionado de maltose a 0,2%
2. Adicionar 200  $\mu$ l células E.coli P2
3. Incubar a 37°C durante uma noite sob agitação constante
4. Centrifugar 10 minutos a 1 000 rpm
5. Decantar e suspender o sedimento em 5ml 10mM MgSO<sub>4</sub>
6. Conservar a suspensão celular a 4°C entre 2 horas (mínimo) até 1 mês (máximo)

*Plaqueamento dos fagos:*

1. Diluir a suspensão de fagos em água estéril:

<i>Tubo #</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Amostra inicial	100 $\mu$ l	-	-	-	-
Diluição anterior	-	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
Água	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l	900 $\mu$ l
Diluição final	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	-

2. Tomar 100  $\mu$ l células E.coli P2 (anteriormente preparadas) para tubo de ensaio
3. Adicionar 0,5  $\mu$ l de cada diluição dos fagos
4. Incubar a 37°C durante 25 minutos
5. Adicionar 8 ml TOP NZY a 50°C
6. Rodar tubo para misturar
7. Verter rapidamente sobre placas Petri contendo agar NZY
8. Deixar solidificar sobre a bancada (10 a 15 minutos)
9. Incubar em estufa a 37°C durante uma noite
10. Observar as placas e registar as observações



Registo de Resultados

BACTERIÓFAGO DE E. COLI

Operador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<i>Placa</i>	<i>Amostra</i>	<i>Número de placas</i>	<i>Observações</i>
#1			
#2			
#3			
#4			
#5			

Título da suspensão inicial de bacteriófagos: \_\_\_\_\_ Unidade infecciosas / ml

\_\_\_\_\_

Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---