



Disciplina: Microbiologia Geral
Curso: Farmácia Unilavras

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LAVRAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CADERNO DE AULAS PRÁTICAS DE
MICROBIOLOGIA GERAL

Profa. Mirelle Oliveira Sóter França
Profa. Júlia Fernanda Urbano Marinho
Prof. Gustavo Henrique Andrade Machado

Lavras, MG

Disciplina: Microbiologia Geral
Curso: Farmácia Unilavras

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Processamento Técnico da
Biblioteca Central do Unilavras

F815c França, Mirelle Oliveira Sóter.
Caderno de aulas práticas de microbiologia geral: [livro eletrônico] /
Mirelle Oliveira Sóter França, Júlia Fernanda Urbano Marinho, Gustavo
Henrique Andrade Machado. Lavras: Unilavras, 2022
241 Kb; Pdf.

Inclui bibliografia
ISBN. 978-65-997886-6-6

1. Gastronomia. 2. Farmácia. 3. Laboratório. I. Marinho, Júlia Fernanda
Urbano, II, Machado, Gustavo Henrique Andrade. III. Título.

CDD 641

EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

➤ **EQUIPAMENTOS E MATERIAIS COMUMENTE UTILIZADOS**

1. Alça e agulha de platina
2. Bico de Bunsen
3. Placas de Petri e tubos de ensaio
4. Meios de cultura
5. Solução salina estéril
6. Pipetas Pasteur, zaragatoas ("swabs")
7. Lâminas e lamínulas para microscopia
8. Corantes
9. Microscópio de luz convencional
10. Estufa
11. Banho-maria
12. Autoclave

➤ **CUIDADOS PARA EVITAR CONTAMINAÇÃO DE CULTURAS**

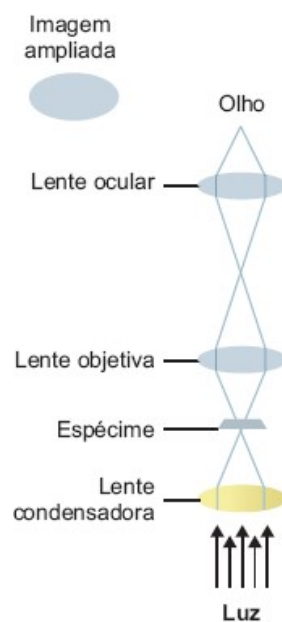
1) A alça e agulha de platina devem ser flambadas, isto é, aquecidas na chama do bico de Bunsen até se tornarem vermelhas, antes e depois de qualquer procedimento de semeadura. A flambagem é mais facilmente e eficientemente conseguida mantendo a agulha ou alça num ângulo de 45° em relação à mesa de trabalho. Antes da coleta do material, deve-se resfriar o instrumento, na parede do tubo, no próprio meio estéril, ou simplesmente aguardando o seu desaquecimento natural por alguns segundos.

2) Em relação às semeaduras procedidas em tubos de ensaio, exige-se flambar a boca dos tubos após a retirada e antes da colocação do tampão de algodão. O tampão de algodão deve ser segurado pelo dedo mínimo da mão oposta à que segura o tubo e nunca deixado sobre a bancada.

3) As pipetas são previamente esterilizadas e embrulhadas em papel. Para sua utilização e ao mesmo tempo evitar que se contaminem, deve-se torcer o papel na região central da pipeta, retirar primeiramente a parte superior do papel e depois a inferior (ponta da pipeta). Depois de utilizada, a pipeta deverá ser colocada dentro de um recipiente apropriado, contendo solução desinfetante.

4) Todo recipiente (placas de Petri ou tubos de ensaio) com cultura ou meio estéril deverá ser manuseado com cuidado de modo a não ficarem abertos e expostos ao ambiente. Com esta medida e mais a exigência de abri-los somente próximo ao bico de Bunsen em tempo suficiente para a semeadura, colheita do material ou simples inspeção, será evitada a sua contaminação por microrganismos do ar. Uma vez semeados, devem ser incubados em estufa. As placas de Petri devem ser envolvidas por filme plástico antes de ser colocadas na estufa e devem permanecer com as tampas voltadas para baixo.

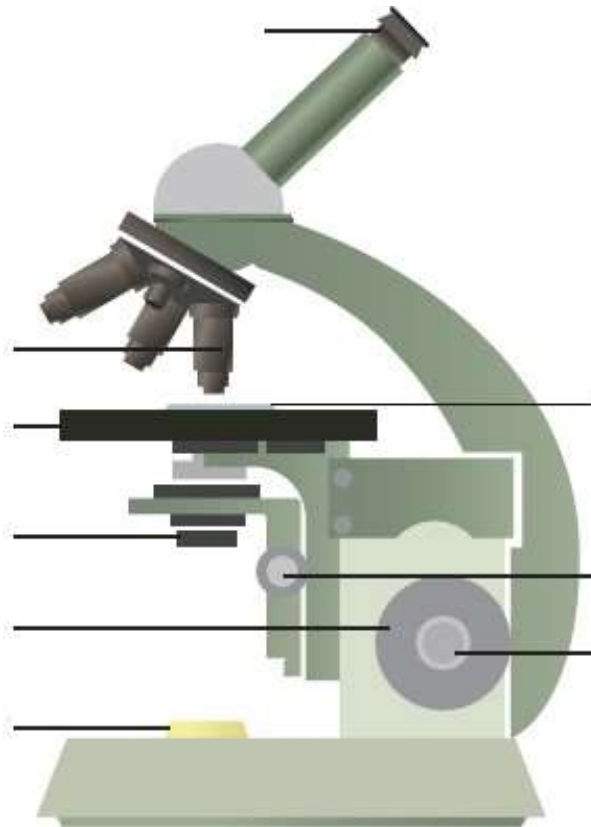
➤ LENTE DO MICROSCÓPIO DE LUZ



Fonte: Adaptado de VERMELHO, A.B. et al.

EXERCÍCIOS

1. Nomeie as partes do microscópio de luz:



Fonte: Esquema simplificado de um microscópio óptico. Adaptado de VERMELHO, A.B. et al.

2. “O processo consiste em manter o material contaminado (previamente lavado e embalado) a uma temperatura elevada, por meio do contato com vapor de água sob pressão, durante um período de tempo suficiente para destruir todos os agentes patogênicos”. Esta é a descrição de qual equipamento do laboratório?

CULTIVO MICROBIANO E VISUALIZAÇÃO **DE LÂMINAS DE BACTÉRIAS**

➤ **SEMEADURA DE CULTURA BACTERIANA**

A alça bacteriológica deve ser esterilizada (na chama azul do bico de Bunsen até incandescer, num ângulo de 45°), esfriada e então usada para distribuir o material microbiológico do primeiro quadrante para o segundo. A seguir, a alça é esterilizada novamente e usada para espalhar o material do segundo para o terceiro quadrante, e então do terceiro para o quarto. Deve-se evitar pressão acentuada da alça, para não rasgar a superfície do ágar (ESTRIDGE; REYNOLDS, 2011).

➤ **IDENTIFICAÇÃO DE LÂMINAS: BACTÉRIAS**

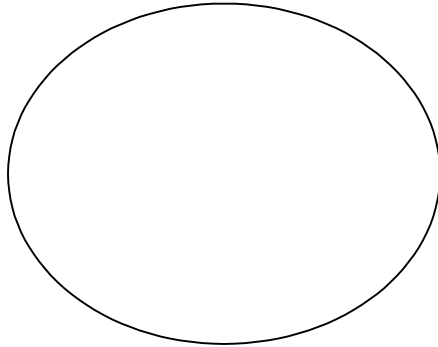
1. Ligar o microscópio e ajustar a intensidade de luz.
2. Utilizar o macrométrico para descer a platina
3. Verificar se o microscópio está na objetiva de menor aumento (4x).
4. Colocar a lâmina sobre a platina.
5. Posicionar, com o auxílio do charriot, o material da lâmina no feixe de luz.
6. Com o auxílio do botão macrométrico, movimentar cuidadosamente a platina, aproximando o material da menor objetiva até que a imagem seja focalizada. Tomar cuidado para que a objetiva não toque a lâmina.
7. Girar o revólver para a objetiva de 10x. Ajustar novamente o foco, agora com o auxílio do micrométrico.
8. Toda vez que for necessário modificar a objetiva, certificar que a imagem já está focalizada previamente à mudança.
9. Nunca utilizar a objetiva de 100x sem óleo de imersão e utilizar o óleo de imersão somente na objetiva de 100x. Após a utilização do óleo de imersão, limpar a objetiva com papel macio.

ANOTAÇÕES GERAIS



Disciplina: Microbiologia
Curso: Farmácia Unilavras

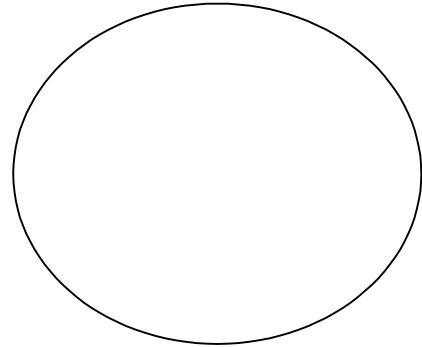
Visualização de Lâminas de Bactérias



Microrganismo:

Forma:

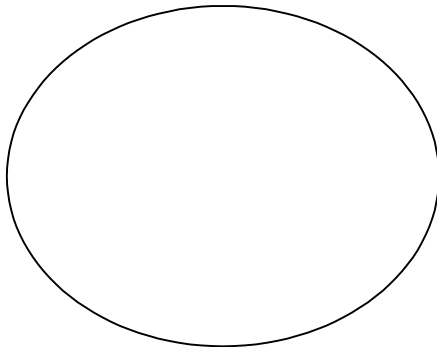
Arranjo:



Microrganismo:

Forma:

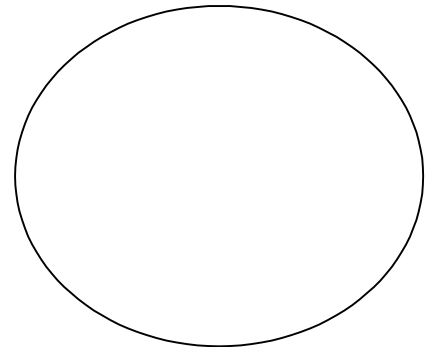
Arranjo:



Microrganismo:

Forma:

Arranjo:



Microrganismo:

Forma:

Arranjo:

COLORAÇÃO DE GRAM E ANÁLISE MICROSCÓPICA

➤ **COLORAÇÃO DE GRAM**

Coloração significa simplesmente corar os microrganismos com um corante que enfatize certas estruturas. As colorações diferenciais reagem de forma diferente com diferentes tipos de bactérias e, assim, podem ser utilizadas para realizar a distinção entre elas. Uma das colorações diferenciais mais importantes e frequentemente utilizadas para bactérias é a coloração de Gram.

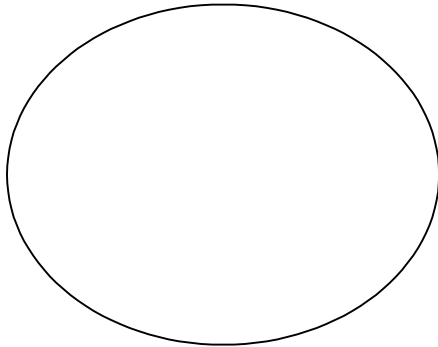
Esta técnica divide as bactérias em dois grandes grupos: as **gram-positivas** e as **gram-negativas**. Os diferentes tipos de bactérias reagem de modo distinto à coloração de Gram, pois diferenças estruturais em suas paredes celulares afetam a retenção ou a liberação do complexo cristal violeta-iodo. Entre essas diferenças destaca-se a espessa camada de peptidoglicano na parede celular das bactérias gram-positivas.

Técnica:

1. Preparar um esfregaço do material em estudo e secá-lo.
2. Fixar o material à lâmina passando rapidamente, por duas ou três vezes, na chama do bico de Bunsen.
3. Cobrir a lâmina com solução de cristal violeta por um minuto.
4. Esgotar a lâmina e lavá-la com água destilada.
5. Cobrir a lâmina com solução de iodo de Gram (Iugol), por um minuto.
6. Esgotar a lâmina e lavá-la com água destilada.
7. Descorar a lâmina com álcool ou álcool-acetona até não haver desprendimento da violeta (cerca de 10 segundos).
8. Esgotar e lavar com água destilada.
9. Contra corar, cobrindo a lâmina com solução de fucsina ou safranina por 30 segundos.
10. Esgotar e lavar com água destilada.
11. Esperar a lâmina secar em temperatura ambiente e observar ao microscópio com objetiva de imersão (100x).

EXERCÍCIOS

Visualização de Lâminas com Coloração de Gram

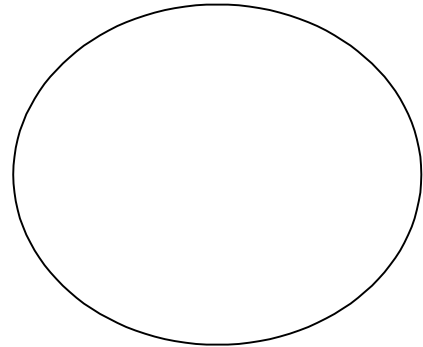


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:

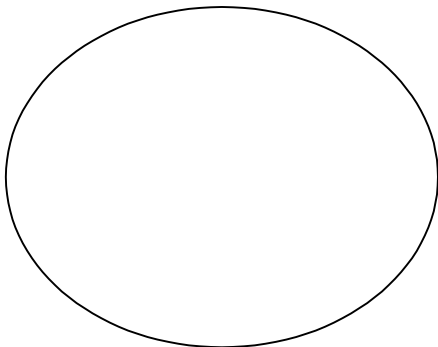


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:

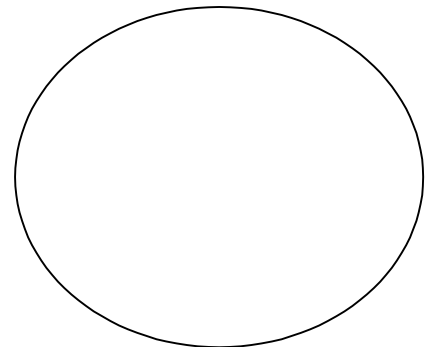


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:



Microrganismo:

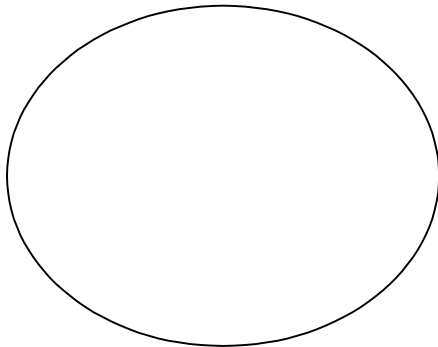
Gram:

Forma:

Arranjo:

EXERCÍCIOS

Visualização de Lâminas de Fungos

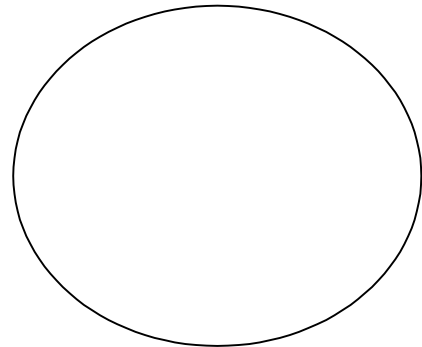


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:

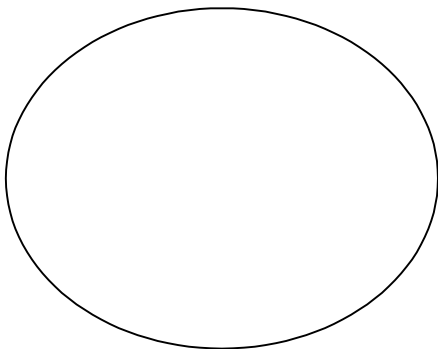


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:

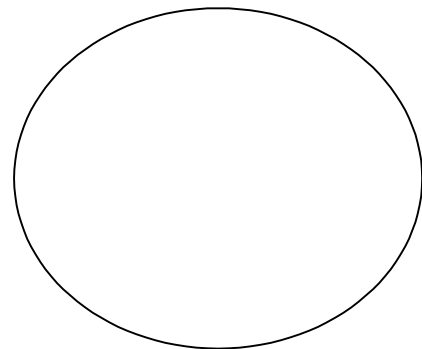


Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:



Microrganismo:

Gram:

Forma:

Arranjo:

ANTIBIOGRAMA

➤ ANTIBIOGRAMA

Alexander Fleming, cientista que teve o mérito de ter descoberto a penicilina, associou suas descobertas e desenvolveu o primeiro método na tentativa de estudar a suscetibilidade microbiana aos antibióticos, dando início à prática do que hoje denominamos **antibiograma** ou **teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)**.

O objetivo deste teste consiste em verificar a sensibilidade de determinado microrganismo a vários antibióticos mediante comparação usando um padrão preestabelecido. Uma das funções mais importantes dos laboratórios de análises clínicas e laboratórios hospitalares é a de detectar, por intermédio desses testes, qual a sensibilidade/resistência do microrganismo que está causando infecção diante de vários antibióticos, de modo a escolher o mais adequado. A informação obtida será usada para determinar qual o antimicrobiano e a quantidade necessária a ser usada na quimioterapia.

Basicamente existem dois métodos para determinar a sensibilidade de uma bactéria aos agentes antimicrobianos: **método da diluição em tubo** (concentração bactericida mínima) e **método da difusão em disco** (Método de Kirby-Bauer).

➤ PRÁTICA: MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Esse teste, aceito como o método-padrão para a realização dos antibiogramas, é tipicamente utilizado para medir a eficácia de uma variedade de antibióticos sobre uma espécie de microrganismo, com a finalidade de fornecer orientação para a prescrição, na prática médica, da maioria dos antibióticos usados na terapia das infecções bacterianas.

1. Agitar bem a cultura bacteriana.
2. Umedecer o *swab* na suspensão bacteriana, retirando o excesso ao apertar o cotonete contra a parede interna do tubo;
3. Fazer a semeadura, passando levemente o swab umedecido sobre toda a superfície do meio de cultura (ágar Mueller-Hinton) de modo homogêneo, inclusive nas bordas.



- Colocar os discos de antibiótico sobre a superfície do ágar inoculado e pressionar levemente com auxílio de uma pinça estéril, de modo que fiquem equidistantes.
- Incubar as placas a 37°C, pelo mínimo de 18 horas e máximo de 48 horas.

➤ INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS: MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Observar a placa do antibiograma, verificando a presença ou a ausência de halos de inibição do crescimento em torno dos discos de antibióticos. A zona clara de inibição (raio do halo de inibição) ao redor de cada disco é medida em milímetros, com o auxílio de régua, e a medida é comparada com uma tabela-padrão de interpretação.

Desta forma, os microrganismos poderão ser classificados em:

- **Sensível (S):** A infecção pode ser tratada com a dosagem recomendada do antimicrobiano.
- **Intermediário (I):** Microrganismos com concentração inibitória mínima do antimicrobiano que alcançam níveis sistêmicos e teciduais, mas a resposta é baixa.
- **Resistente (R):** Concentrações sistêmicas usuais do antimicrobiano, não inibem o microrganismo, gerando ineficácia clínica.

Tabela 1. Tabela para interpretação dos halos de inibição

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO	SIGLA	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
Gentamicina	10ug	GEN	12 ou -	13 a 14	15 ou +
Ceftazidima	30ug	CAZ	14 ou -	15 a 17	18 ou +
Sulfazotrim	25ug	SUT	10 ou -	11 a 15	16 ou +
Cloranfenicol	30ug	CLO	12 ou -	13 a 17	18 ou +
Tetraciclina	30ug	TET	14 ou -	15 a 18	19 ou +

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.

VERMELHO, A.B. et al. **Práticas de Microbiologia**. Disponível em: Minha Biblioteca, (2. ed.). Grupo GEN, 2019.

BAAR- BACILOSCOPIA

➤ **PESQUISA DE BACILO ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE (BAAR)**

Uma coloração diferencial importante (que diferencia bactérias em grupos distintos) é a coloração acidorresistente, que se liga fortemente apenas às bactérias que apresentam um material ceroso em suas paredes celulares. Essa coloração é utilizada para a identificação de todas as bactérias do gênero *Mycobacterium*, que inclui os importantes patógenos *Mycobacterium tuberculosis* (agente causador da tuberculose) e *Mycobacterium leprae* (agente causador da hanseníase), assim como na identificação de linhagens patogênicas do gênero *Nocardia*. Tanto as bactérias do gênero *Mycobacterium* quanto do *Nocardia* são acidorresistentes. As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes, os quais são circundados por uma parede celular hidrofóbica, e que resistem a descoloração causada pelas misturas de álcool-ácido usadas na identificação.

➤ **PRÁTICA: TÉCNICA ZIEHL-NEELSEN**

No procedimento de coloração acidorresistente, o corante vermelho carbolfucsina é aplicado a um esfregaço fixado, e a lâmina é aquecida levemente por vários minutos (o calor aumenta a penetração e a retenção do corante). A seguir, a lâmina é resfriada e lavada com água. O esfregaço, então, é tratado com álcool-ácido, um descolorante, que remove o corante vermelho das bactérias que não são acidorresistentes. Os microrganismos acidorresistentes retêm a cor vermelha ou rosa, pois a carbolfucsina é mais solúvel nos lipídeos da parede celular do que no álcool-ácido. Nas bactérias que não são acidorresistentes, cujas paredes celulares não possuem os componentes lipídicos, a carbolfucsina é rapidamente removida durante a descoloração, deixando as células incolores. O esfregaço é, então, corado com o contracorante azul de metileno. As células que não são acidorresistentes aparecem azuis após a aplicação do contracorante, enquanto as micobactérias permanecem na cor vermelha ou rosa.

