

Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

Julio Cesar Tocacelli Colella

Bruna Broti Rissato

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS EM MICROBIOLOGIA

Este livro foi preparado para preencher os requisitos da disciplina de microbiologia agrícola em seu conteúdo prático, introduzindo gradualmente o discente da área de agrárias os diferentes aspectos de um laboratório básico de microbiologia e as técnicas básicas de trabalho e experimentos envolvendo aspectos aplicados da microbiologia agrícola. Neste livro daremos foco as Normas Gerais do Laboratório de Microbiologia Agrícola e a Limpeza do Laboratório, o que é Microscópio e Microscopia, como devemos Acondicionar as Vidrarias e outros Materiais, modos de preparo de Meios de Cultura para os microrganismos, quais são e as funções dos Métodos de Esterilização, o que é e técnicas de Isolamento de Cultura Pura, como montar as Preparações Microscópicas e a Coloração de Gram, uma metodologia para o Isolamento de *Azotobacter*, como Identificar de Bactérias através de Provas Bioquímicas, quais as Relações Interspecíficas dos Microrganismos, demonstrar o que são as Micorrizas, como isolar Fungos e observá-los e uma metodologia para Análise Bacteriológica da Água.

Centro Universitário UniFatecie

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS EM MICROBIOLOGIA



Paranavaí-PR
EduFatecie
2020

Copyright © 2020 para a EduFatecie.

Todos os direitos reservados. Proibida a reprodução, mesmo parcial, por qualquer processo mecânico, eletrônico, reprográfico, etc., sem a autorização, por escrito, da editora.

Todos os direitos reservados desta edição 2020 para EduFatecie.

Todas as informações da obra, ora publicada, como as marcas registradas, os logoss, as imagens e quaisquer outros conteúdos utilizados, são de responsabilidade dos autores.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP

S398m	Schwan-Estrada, Kátia Regina Freitas Manual de aulas práticas em microbiologia / Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, Julio Cesar Tocacelli Colella, Bruna Broti Rissato. Paranavaí: EduFatecie, 2020. 74 p. ; il. ; color. Inclui bibliografia ISBN 978-65-87911-10-6 (E-book) 1. Microbiologia – Manuais de laboratório. 2. Laboratórios microbiológico – Medidas de segurança. I. Freitas Schwan-Estrada Kátia Regina. II. Colella, Julio Cesar Tocacelli. III. Rissato, Bruna Broti. IV. Faculdade de Tecnologia e Ciências do Norte do Paraná, UniFatecie. IV. Título. CDD : 23 ed. 579
-------	--

Catalogação na publicação: Zineide Pereira dos Santos – CRB 9/1577

<https://orcid.org/0000-0001-5409-4194>



Unidade III: BR 376, km 102 - Paranavaí-PR
(Saída para Nova Londrina)
(55) (44) 3045 9898 / (55) (44) 99976-2105
www.unifatecie.edu.br



EXPEDIENTE:

Diretor Geral: Prof. Ms. Gilmar de Oliveira
Diretor de Ensino: Prof. Ms. Daniel de Lima
Diretor Financeiro: Prof. Eduardo Luiz Campano Santini
Diretor Administrativo: Prof. Ms. Renato Valença Correia
Secretário Acadêmico: Tiago Pereira da Silva
Coord. de Ensino, Pesquisa e Extensão-CONPEX: Prof.ª Dr.ª Nelma Sgarbosa R. de Araújo
Coordenação Adjunta de Ensino: Prof. Dr. Flávio Ricardo Guilherme
Coordenação Adjunta de Pesquisa: Prof.ª Dr.ª Denise Kloeckner Sbardelotto
Coordenação Adjunta de Extensão: Prof. Esp. Heider Jeferson Gonçalves
Coordenador NEAD - Núcleo de Educação a Distância: Prof. Me. Jorge Luiz Garcia Van Dal

EQUIPE EXECUTIVA:

Editora-chefe:
Prof.ª Dr.ª Denise Kloeckner Sbardelotto
Editor-adjunto:
Prof. Dr. Flávio Ricardo Guilherme
Revisão Ortográfica e Gramatical:
Prof.ª Esp. Bruna Tavares Fernandes
Projeto Gráfico/Design/Diagramação:
André Oliveira Vaz
Setor Técnico:
Fernando dos Santos Barbosa

Controle Financeiro:
Prof. Eduardo Luiz Campano Santini
Assessoria Jurídica:
Prof.ª Ms. Leticia Baptista Rosa
Ficha catalográfica:
Tatiane Viturino de Oliveira e
Zineide Pereira dos Santos
Secretária:
Natália Macedo de Souza
www.unifatecie.edu.br/editora
edufatecie@fatecie.edu.br

CONSELHO EDITORIAL:

Prof. Dr. Alexander Rodrigues de Castro
Prof. Ms. Arthur Rosinski do Nascimento
Prof.ª Dr.ª Cassia Regina Dias Pereira
Prof.ª Dr.ª Claudinéia Conatoni da Silva Franco
Prof. Dr. Cleder Mariano Belleri
Prof. Ms. Daniel de Lima
Prof.ª Dr.ª Denise Kloeckner Sbardelotto

Prof. Dr. Fábio José Bianchi
Prof. Dr. Flávio Ricardo Guilherme
Prof.ª Dr.ª Gléia Cristina Laverde Ricci Cândido
Prof. Dr. Heraldo Takao Hashiguti
Prof. Dr. Hudson Sérgio de Souza
Prof.ª Dr.ª Jaqueline de Carvalho Rinaldi
Prof. Dr. Julio Cesar Tocacelli Colella
Prof.ª Ms. Leticia Baptista Rosa

Prof. Ms. Manfred Zamponi
Prof. Dr. Marcelo Henrique Savoldi Picoli
Prof. Dr. Marcos Paulo Shiozaki
Prof.ª Dr.ª Nelma Sgarbosa Roman de Araújo
Prof. Dr. Paulo Francisco Maraus
Prof. Dr. Rená Moreira Araújo
Prof. Dr. Ronan Yuzo Takeda Violin

1ª Edição E-book: outubro de 2020.
Paranavaí – Paraná – Brasil

SUMÁRIO

I. Normas gerais do Laboratório de Microbiologia Agrícola.....	4
II. Limpeza do Laboratório.....	7
1. MICROSCÓPIO E MICROSCOPIA.....	9
2. ACONDICIONAMENTO DE VIDRARIAS.....	14
3. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA.....	17
4. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO.....	23
5. ISOLAMENTO DE CULTURA PURA.....	29
6. PREPARAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	33
7. COLORAÇÃO DE GRAM.....	36
8. ISOLAMENTO DE <i>Azotobacter</i>	38
9. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS - PROVAS BIOQUÍMICAS	40
10. RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS	47
11. MICORRIZAS.....	50
12. ISOLAMENTO DE FUNGOS	55
13. OBSERVAÇÃO DE FUNGOS I.....	58
14. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA.....	62
III. APÊNDICE: Corantes, Reagentes e Meios de Cultura.....	66
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	72
SOBRE OS AUTORES.....	74

I. Normas gerais do Laboratório de Microbiologia Agrícola

Nos Laboratórios de Microbiologia, os acidentes ocorrem com certa frequência, compreende desde infecções devido à manipulação de microrganismos até acidentes com produtos químicos.

No Brasil, é quase inexistente um sistema de controle de Laboratórios de Microbiologia. Porém, em países em que este controle é mais rigoroso, são relatados milhares de infecções adquiridas nestes locais de trabalho. Em geral, as principais vítimas são: pesquisadores, auxiliares e alunos. Os principais motivos para tal: falta de conhecimento, falta de proteção e descuido no manuseio dos materiais durante os experimentos.

Para que fatos assim não ocorram, verifica-se a necessidade de um treinamento adequado para os que trabalharão ou usarão o laboratório, bem como os usuários esporádicos (como os trabalhadores da limpeza), ou seja, prevenção para a maioria dos acidentes.

Para que se tenha a segurança dos usuários e o bom desempenho dos trabalhos no Laboratório de Microbiologia, há de se seguir certos princípios básicos. Sendo eles:

1. Não permitir a entrada e permanência de pessoas estranhas no laboratório e sempre ter o hábito de limpeza e organização.
2. Lavar as mãos antes e após o término dos trabalhos.
3. **É obrigatório o uso jaleco no laboratório** e, quando necessário, luvas estéreis descartáveis; colocar paletós, blusas e outros objetos nos lugares apropriados para este fim e nunca sobre as mesas do laboratório.
4. Pessoas com cabelos compridos: mantê-los presos com elástico. Caso forem muito compridos: prender toda sua extensão, formando um “coque”. Se possível, colocar uma touca ou gorro, assim permanecerão protegidos caso desmanche.
5. Limpar e desinfestar as bancadas e capela no início e final do trabalho.
6. A alça e/ou agulha de repicagem devem ser esterilizadas (flambagem) na chama do bico de Bunsen antes e depois de usadas. Colocá-las sempre em posição vertical no suporte e não sobre a mesa.

7. Nunca usar frascos do laboratório (Becker, erlenmeyer etc.) para beber água.
8. Os refrigeradores, micro-ondas e estufas não são apropriados para aquecer ou conservar alimentos a serem consumidos.
9. Não colocar na boca qualquer material que tenha entrado em contato com os agentes microbianos, isso inclui lápis, canetas e borrachas.
10. As mesas ou bancadas devem ter a superfície lisa, sendo resistente, de fácil limpeza e desinfecção.
11. Ler atentamente as especificações sobre os produtos químicos que serão utilizados.
12. Ter todo cuidado possível no uso de aparelhos e materiais do laboratório, principalmente, aos que possam causar ferimentos na pele. Se não estiver familiarizado com o uso de qualquer aparelho e/ou materiais, peça orientação ao Professor ou Técnico responsável.
13. Não cheirar os meios de culturas inoculados.
14. Após a utilização de lâmina e lamínulas, colocar as mesmas em um recipiente com desinfetante.
15. Não colocar qualquer material contendo contaminantes na mesa ou na bancada, mas sim em um recipiente que permita a identificação para sua limpeza e esterilização.
16. Fazer o descarte apropriado de materiais microbiológicos e químicos.
17. Antes de deixar o laboratório, ordenar todo material usado colocando-o em seus respectivos lugares, bem como fechar a água, gás, desligar o interruptor e a tomada do microscópio.
18. Identificar todo material utilizado em aulas práticas e/ou trabalho prático (nome do microrganismo, nome do aluno ou responsável, data de repicagem, meio de cultura) antes da incubação.
19. **É expressamente proibido fumar e ingerir alimentos no laboratório.**
20. Em caso de acidente pessoal, levar o caso imediatamente ao conhecimento do Professor.

Além das normas anteriores, durante as aulas de laboratórios, as seguintes normas devem ser seguidas:

1. Não trabalhar em corrente de ar e, se possível, nem em ambiente agitado pelo acúmulo de pessoas.
2. Nunca falar e nem respirar forçosamente em frente ao recipiente aberto contendo material de estudo.
3. Sempre abrir o recipiente inclinado junto à chama e do lado oposto em que o ar está rarefeito de formas vivas e gotículas de saliva, assim estas serão incineradas pela chama.
4. Retirar o tampão de algodão com o dedo mínimo e a palma da mão sem tocar na boca do recipiente e sem encostar o tampão em lugar algum.
5. Flambar a boca do recipiente sempre que for iniciar uma inoculação, para que uma corrente de ar quente seja formada de dentro para fora.
6. Introduzir o mais rápido possível a alça ou pipeta sem tocar nas paredes do recipiente.
7. Ao terminar a inoculação, flambar a boca do recipiente e ajustar o tampão, conservando o material ao abrigo da poeira e umidade.

II. Limpeza do Laboratório

O laboratório possui equipamentos e produtos químicos utilizados nos procedimentos realizados internamente, os quais podem apresentar riscos eminentes para quem transita nesse recinto.

O ambiente laboratorial sempre será um local destinado aos estudos experimentais em qualquer ramo da ciência. Esse local concentra pessoas, equipamentos, vidrarias e outros materiais e, por isso, a execução do serviço de limpeza do Laboratório de Microbiologia deve observar cuidados especiais.

A limpeza do piso, aparentemente, é um trabalho comum. Utiliza-se água sanitária, limpa-manchas, entre outros produtos comumente usados para limpeza de salas, mas que podem ser incompatíveis com produtos e materiais que são manipulados no laboratório, pois esses produtos normalmente possuem ácidos em sua composição, podendo gerar risco de acidente. Assim o uso negligente desses produtos, em laboratórios, acarretará desde uma simples intoxicação química, passando por queimaduras, chegando até a morte.

Por exemplo, água sanitária comprada em supermercados, que são usadas para a limpeza de vasos sanitários, pisos, mesas e outros locais, é um poderoso oxidante, mas com ação corrosiva em metais e em contato com ácidos e amônia libera gases tóxicos, por isso, informar os funcionários da limpeza sobre os procedimentos a serem adotados sempre quando for feita uma limpeza ao final de uma aula e/ou experimento.

A limpeza geral do laboratório deve ser feita em função da quantidade de lixo produzida e o seu nível de sujeidade; em relação à limpeza do piso: necessário que seja feita uma vez ao dia ou quando solicitado, informar sempre quais os produtos químicos foram utilizados no local.

Mensalmente, incluir na limpeza geral: teto, vidros das janelas, paredes, bancadas e pisos, mas sempre com a presença do técnico, professor ou responsável pelo laboratório, pois a limpeza de bancadas e vidrarias é de sua atribuição, não sendo executada por terceiros; existem equipamentos delicados que necessitam de cuidados para sua remoção de lugar e limpeza. Os responsáveis são instruídos para essa execução, bem como sabem quais

são os aparelhos que, em hipótese alguma, podem ser removidos de seu local.

Deve-se evitar ou abolir o uso de ceras e outros produtos que deixem o piso escorregadio; deve-se proibir o uso de aerossóis, por dois motivos: evitar a contaminação das amostras e, principalmente, para evitar que o mesmo se torne um laça chamas em locais que possuam bico de gás ou lamparinas ligados.

Já para evitar uma “contaminação cruzada” é necessária uma atenção especial, principalmente em laboratórios em que o ambiente asséptico seja imprescindível, assim evitando a perda total ou parcial de experimentos. Para evitar esse problema, manter as roupas e mãos limpas mesmo antes de entrar no laboratório e os materiais de limpeza ser exclusivos para aquele laboratório.

Os principais motivos da ocorrência da “contaminação cruzada” são: uso de equipamentos, panos, flanelas, mãos etc., transferindo microrganismos de um local contaminado para um esterilizado.

Nos períodos de utilização do laboratório, é necessária uma limpeza minuciosa no início e no fim de seu uso; a limpeza da bancada será com uma solução detergente, seguida de uma solução alcoólica a 70%. A vidraria e materiais: previamente esterilizados e a câmara de fluxo laminar e/ou a capela devem estar limpos, do mesmo modo como foi limpo a bancada do laboratório. Em alguns laboratórios, as vidrarias são lavadas com uma solução sulfocrômica, porém está em desuso por conter cromo, metal pesado, pode intoxicar células vivas e é de difícil remoção no material.

O trabalho dentro de um laboratório de microbiologia exige muita concentração e, por isso, **conversas desnecessárias são dispensadas**. Não distrair os técnicos e professores quando estiverem realizando algum procedimento, mesmo que seja o mais simples de todos.

Questões:

- Por que ter cuidado ao usar água sanitária na limpeza do laboratório?
- Como proceder nas limpezas diárias e mensais do laboratório?
- O que é “contaminação cruzada” e como pode ocorrer no laboratório?

1. MICROSCÓPIO E MICROSCOPIA

O microscópio é um instrumento muito útil em laboratório de microbiologia, pois permite a visualização de organismo e de estruturas invisíveis a olho nu. Existem diversos tipos de microscópios e técnicas já desenvolvidas para preparação a exames de microrganismos com vantagens específicas.

Exemplo: Microscópio de campo escuro: fundo escuro, contra o qual os objetos focalizados são iluminados. Microscópio eletrônico: aumento de 300.000 a 400.000 vezes.

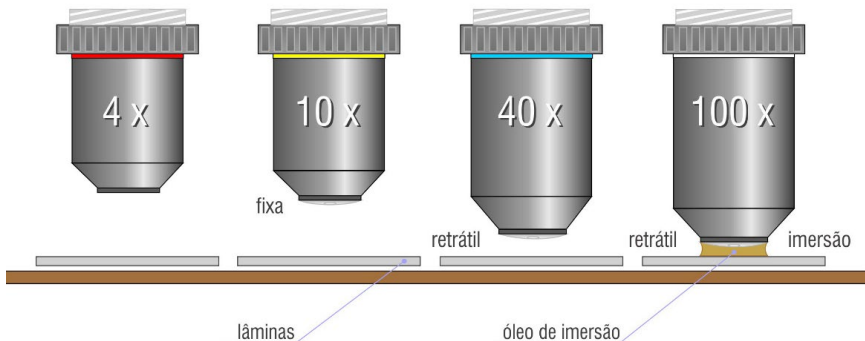
O microscópio luminoso é o rotineiramente utilizado em trabalhos microbiológicos e, nesse caso, o campo microscópio ou área observada aparece iluminada e os objetos estudados apresentam-se escuros. Os microscópios luminosos são do tipo simples ou composto de acordo com o número de lentes empregadas.

O microscópio que será utilizado neste laboratório é do tipo composto, empregando dois sistemas de lentes: a lente ocular e a objetiva.

Partes do Microscópio:

- Base
- Fonte de Iluminação
- Botão do Condensador
- Condensador
- Diafragma
- Platina (ou Mesa)
- Presilha
- Canhão
- Charriot
- Parafuso Macrométrico
- Parafuso Micrométrico
- Braço
- Lentes Objetivas (4x, 10x, 40x, 100x)
- Lentes Oculares (10x)
- Revolver

Tipos de objetivas:



Fonte: Nikon Inc., 2012, s/p.

Obs.: Ampliação = aumento da objetiva x aumento da ocular (gravações encontradas nas objetivas do microscópio).

Exemplo: 40; 0,65; 0,17.

40: poder de aumento da lente (40x)

0,65: abertura numérica da lente objetiva

0,17: espessura numérica da lamínula que deve cobrir o objeto, dada em milímetros.



Fonte: Nikon Inc., 2012, s/p.

- Considerações:

a) Poder de resolução: é a capacidade de distinguir, separadamente, dois pontos adjacentes, ou seja, o maior aumento produzido por um microscópio pode ser o mais útil, porque a imagem obtida pode ser pouco definida. O poder de resolução de um microscópio é em função do comprimento de onda da luz utilizada e dos valores de abertura numérica (AN) que é características do sistema de lentes e está gravada na objetiva.

b) Abertura Numérica (AN)

$$AN = \eta \sin \Theta$$

Onde:

Θ - é a metade do ângulo do cone de luz que entra na objetiva.

η - índice de refração do meio que preenche o espaço entre a objetiva e a lâmina.

Para objetiva 4X, 10X, e 40X o valor de $\eta = 1$ (índice de refração do ar) e para a objetiva 100X, $\eta = 1,56$ (índice de refração do óleo de imersão).

c) Limite de Resolução: dimensão do menor objeto que pode ser visualizado.

- Procedimento correto para focalização:

- a) Acenda a luz do microscópio;
- b) Destrave o microscópio movimentando a alavanca. Verifique a posição da alavanca se está travada e destravada;
- c) Gire o revólver, encaixando a objetiva de menor aumento (4X). Faça isso olhando lateralmente, facilitará a operação;
- d) Coloque a lâmina na platina, segurando-a com a mão direita e abrindo a presilha com a mão esquerda. **Não toque no corpo da lâmina**; segurá-la como se fosse um negativo fotográfico. Verifique sempre se a lâmina está voltada para cima e se está bem encaixada. Solte a presilha. Centralize o material no orifício da platina utilizando os parafusos da Charriot;
- e) Levante a mesa (ou platina) movimentando o parafuso macrométrico até o ponto máximo. **Não force o parafuso** quando chegar ao final, pois danificará as roscas;
- f) Verifique se o diafragma está aberto, olhando lateralmente (se não tiver, abra-o movimentando a alavanca correspondente); o condensador deve ser mantido em sua posição mais alta;
- g) Agora, olhando através da ocular, **com os dois olhos abertos**, e utilizando o parafuso macrométrico, desça lentamente a mesa até o material a ser observado. Assim que isso ocorrer, corrija a focalização utilizando o parafuso micrométrico;

- h) Após percorrer o campo, passe para objetiva de aumento médio (10X) e corrija a focalização utilizando o parafuso micrométrico. Observe o campo atentamente procurando percorrê-lo totalmente utilizando os parafusos da Charriot. Feito isso, passe para objetiva de 40X;
- i) Verifique se a focalização modifica ao abrir ou fechar o diafragma.
- j) Para uma postura correta do usuário do microscópio, faz-se necessário que a mão direita fique nos parafusos do “Charriot” e a mão esquerda, no parafuso micrométrico. Assim percorrerá e estudará o campo todo da preparação. A atividade ao microscópio é estritamente dinâmica.
- k) Terminando a observação:
- Encaixe a objetiva de menor aumento;
 - Abaixar a mesa (ou platina) com o auxílio do Macrométrico;
 - Desligue a luz;
 - Retire a lâmina.

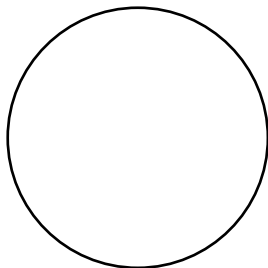
Observação: não movimente a mesa do microscópio com a objetiva de maior aumento encaixada.

Exercício Prático

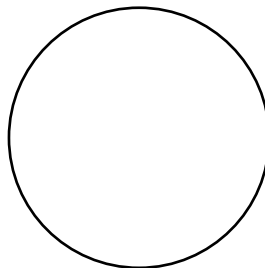
Material:

- Lâminas e lamínulas; - Corantes; - Culturas de fungos, leveduras e bactérias.

Focalizar as preparações entre lâminas e lamínulas (preparação a fresco) disponíveis e observar. Esquematizar o(s) microrganismo(s) observado(s) anotando o aumento, bem como citar as principais características das formas microbianas observadas.



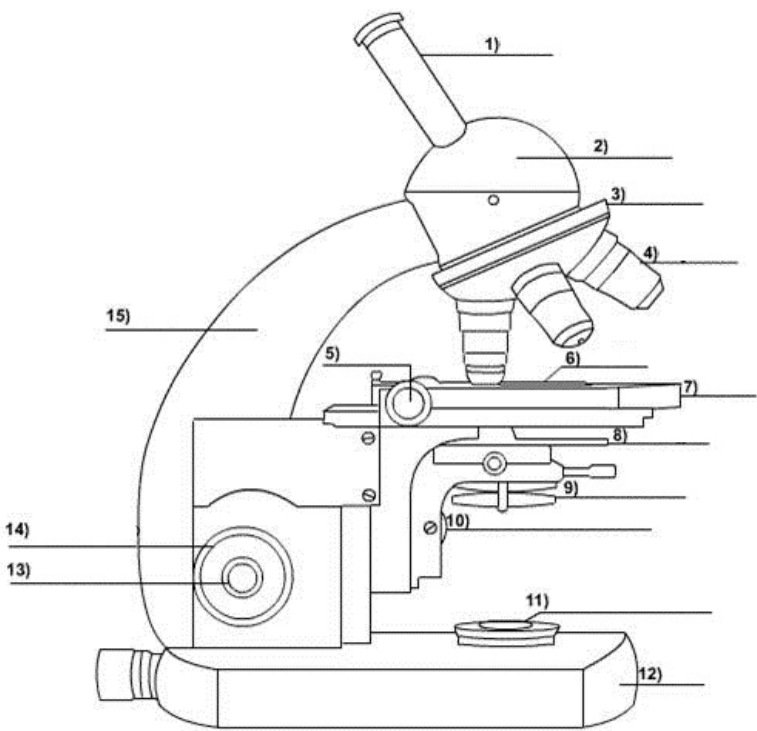
Aumento:



Aumento:

Questões

- 1) Enumerar os cuidados a serem observados para a conservação do microscópio.
- 2) Nomear as partes do microscópio assinaladas na Figura abaixo



Fonte: Autor - adaptado da internet.

- 1- _____
- 2- _____
- 3- _____
- 4- _____
- 5- _____
- 6- _____
- 7- _____

- 8- _____
- 9- _____
- 10- _____
- 11- _____
- 12- _____
- 13- _____
- 14- _____

2. ACONDICIONAMENTO DE VIDRARIAS

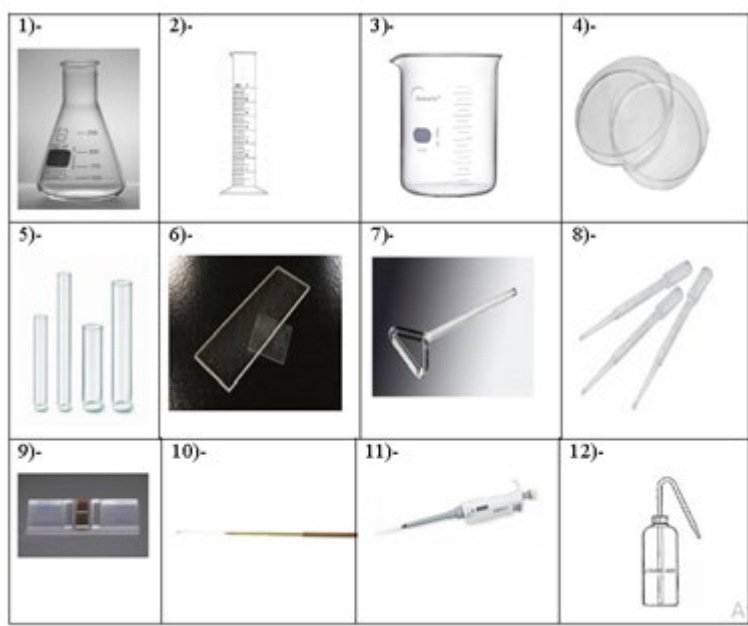
Todo material utilizado em trabalhos microbiológicos deve ser perfeitamente limpo e estéril, isto é, isento de microrganismo. A vidraria, após lavagem (água e sabão) e secagem (estufa), deve ser acondicionada em papel e esterilizada por autoclavagem (121 °C / 20-30 min).

Porém, antes da autoclavagem, observar os seguintes procedimentos:

- o bocal das vidrarias, como tubos de ensaio, erlenmeyer e pipetas: vedar com tampão de algodão e proteger com invólucro de papel;
- os tubos de ensaio: acondicionar em números ímpares, a partir de três. Amarrar e colocar em cesta metálica; a parte superior do conjunto é recoberta por papel manilha ou jornal;
- as pipetas: acondicionar individualmente e identificar seu volume no papel ou acondicionar em pacotes de papel (todas do mesmo volume).
- as placas de Petri: embrulhar em papel, conjuntos de três.

Os principais materiais e vidrarias são:

Erlenmeyer (1), proveta (2), béquer (3), placas de Petri (4), tubos de ensaio (5), lâminas e lamínulas (6), alça de Drigasky (7), pipeta de Pasteur (8), câmara de Neubauer (9), alça de inoculação (ou de platina) (10), pipetas automáticas (11) e pisseta (12).



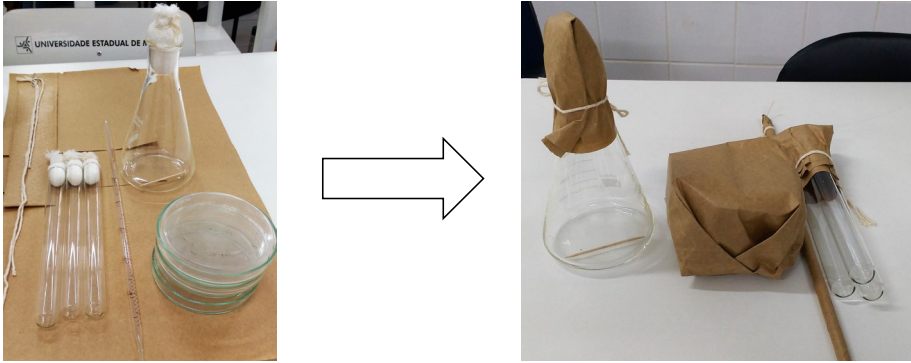
Fonte: Silva e Batista et. al., 2016.

Exercício Prático

Material:

- erlenmeyer (1)
- placas de Petri (3)
- pipeta (1)
- tubos de ensaio (3)

Acondicionar as vidrarias (figura abaixo) de acordo com as instruções do Professor e o Técnico do Laboratório.



Fonte: Schwan-Estrada, 2018.

Questões

a) Descreva as funções dos materiais apresentados em aula.

b) O que é e qual a importância do acondicionamento de vidrarias?

3. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

Todos os organismos vivos necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes. Esses elementos são imprescindíveis para a síntese e para as funções normais dos componentes celulares. Eles existem na natureza na forma de compostos orgânicos ou inorgânicos.

O meio de cultura ou de cultivo é um substrato que fornece todos os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento em laboratório de uma estirpe, espécie ou grupo de microrganismos. As exigências nutricionais dos microrganismos, em relação aos elementos requeridos, são bastante semelhantes àquelas exigidas pelas plantas ou animais, ou seja, necessitam de carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, cálcio, potássio, magnésio, além dos micronutrientes e vitaminas.

A diferença básica entre os microrganismos, as plantas e os animais são quanto à fonte de cada elemento.

Os microrganismos podem utilizá-los tanto na forma orgânica como inorgânica. Há os microrganismos capazes de se desenvolver em meios inteiramente inorgânicos, que são chamados de **autotróficos**, bem como os que exigem compostos orgânicos, que são chamados de **heterotróficos**.

As plantas utilizam os elementos na forma inorgânica predominantemente; os animais, na forma orgânica.

A composição química dos meios de cultura destinados ao crescimento de fungos e bactérias é extremamente variável. Em função da composição química, os meios de cultura são divididos em três tipos:

Meios de cultura complexos ou indefinidos: são os componentes que possuem todas as fontes de nutrientes requeridas pelos microrganismos, contudo a quantidade exata não é especificada. Esses meios de cultura são preparados a partir de produtos naturais, como: Extrato de carne - solução aquosa de carne bovina concentrada em pasta; Peptona - proteínas que foram parcialmente degradadas por enzimas (como hidrolisado de caseína do leite, hidrolisado de proteínas da soja, carne, gelatina e outras fontes de proteínas); Extrato de levedura, sangue, soro, leite, extrato de solo e fluido de rúmen - todos esses materiais são complexos e contêm açúcares, aminoácidos, vitaminas e sais.

Meios quimicamente definidos: são os meios nos quais a composição exata de cada nutriente ou elemento químico é conhecido. Adicionar ou retirar um determinado elemento do meio permite conhecer se aquele constituinte em particular é essencial para o crescimento de determinado microrganismo (fator de crescimento). Ex.: Meio de cultura quimicamente definido para o crescimento de bactérias heterotróficas.

Meios seletivos: são designados para o **aumento** do crescimento de um determinado microrganismo em **detrimento** de outros.

Meios Diferenciais/seletivos: utilizados para diferenciar microrganismos, entre vários tipos, em uma mesma placa. Empregados para determinar qualidade de água e de alimentos em geral. Ex.: Agar MacConkey, que contém sais biliares e cristal violeta para inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e, portanto, permite o crescimento de bactérias Gram negativas. Além disso, esse meio permite uma diferenciação entre as bactérias Gram negativas a partir da produção de ácido por meio da lactose presente no meio. Colônias que usam a lactose acidificam o meio e ficam na cor vermelha.

Meios de Enriquecimento: esse favorece o crescimento de uma determinada espécie, mas não o de outras presentes numa população mista. Técnicas de enriquecimento (físicas e químicas) favorecem o meio ambiente para o crescimento do microrganismo. Nenhum produto inibidor é utilizado para prevenir o crescimento de microrganismos indesejáveis (como acontece nos meios seletivos). Ex.: Bactérias que oxidam fenol podem ser isoladas de amostra de solo utilizando meio de cultura com sais de amônia e fenol como única fonte de carbono. Somente microrganismos que utilizem fenol estarão presentes.

Já em relação aos **estados físicos**, os meios de cultura classificam-se em: Líquidos, sólidos e semissólidos. Para o preparo dos meios sólidos e semissólidos, deve-se adicionar um agente solidificante à solução de nutrientes previamente preparada. O **Agar** é hoje o agente solidificante mais utilizado, sendo considerado também o melhor, porque pode ser liquefeito à tempe-

ratura de fervura e pode ser resfriado à temperatura de 42-45°C, antes de solidificar. O seu ponto de fusão é de 80°C a 100°C.

O Agar é um excelente agente solidificante, porque não é degradado por microrganismos, sendo um polímero composto principalmente de D-galactose, 3,6-anidro-L-galactose e ácido D-glucurônico. É normalmente extraído de algas vermelhas (*Gelidium corneum* - alga marinha japonesa) a 80°C com H₂SO₄ diluído. O Agar é utilizado, normalmente, nos meios de cultura a 1,5-2,0 % para os meios sólidos e a 0,5-0,7% para os meios semissólidos.

Exercício Prático

Material:

- Extrato de carne, peptona, batatinha, dextrose, Agar;
- Frascos Erlenmeyer de 250 e 500 ml;
- Proveta de 500 ml;
- Água destilada;
- Tubos de cultura;
- Algodão, papel de filtro;
- Pipeta.

Preparar os meios de cultura descritos abaixo:

1. Caldo nutritivo ou caldo simples

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000 ml

2. Agar nutritivo

Caldo nutritivo	1000 ml
Agar	15g

3. B.D.A. (Batata-Dextrose-Ágar).

Batata	200 g
Dextrose	18 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 ml

Preparo de meio de cultura:

Cuidados:

- Pesar corretamente todos os componentes;
- Os produtos de baixa solubilidade devem ser dissolvidos separadamente;
- Distribuir o volume total em recipientes menores, conforme necessidade de uso;
- Esterilizar imediatamente após o preparo;
- Identificar os frascos;
- Evitar esterilizações sucessivas.

1. Caldo nutritivo

- a) Colocar 300 ml de água destilada num frasco Erlenmeyer;
- b) Adicionar 0,3% de extrato de carne e 0,5% de peptona. Dissolver por aquecimento ligeiro. Esfriar a temperatura ambiente;
- c) Distribuir 100 ml em tubos;
- d) Colocar tampão de algodão e fazer a esterilização em autoclave (121°C/20 min);
- e) Incubar o tubo não esterilizado e um tubo esterilizado a 37 °C / 24 - 48 horas.

2. Agar nutritivo

- a) Acrescentar ao restante do caldo nutritivo 1,5% de ágar-ágar;
- b) Aquecer em banho-maria, sob agitação constante, até completa dissolução do Agar;
- c) Distribuir o meio de cultura nos tubos;
- d) Colocar tampão de algodão, papel alumínio e fazer a esterilização em autoclave (121°C/15 min), deixando um tubo sem esterilizar.
- e) Colocar os tubos em posição inclinada para solidificação do meio. Incubar um tubo esterilizado a 37 °C e um não esterilizado de 24 a 48 horas.

3. B.D. A (batata-dextrose-ágar).

- a) Cortar a batata e cozinhar em 500 ml de água destilada;
- b) Extrair todo o líquido e filtrar;
- c) Fundir o Agar em 500 ml de água, em banho-maria;
- d) Dissolver a dextrose em 50 ml de água;
- e) Misturar os três e completar com água destilada até 1000 ml;
- f) Distribuir
em tubos de ensaio, colocar tampão de algodão, acondicionar e esterilizar a 121°C / 20 min;
- g) Inclinare os tubos de cultura após a esterilização, incubar a 37 °C / 24 - 48 horas.

Questões:

- 1- O que é peptona?
- 2- Nos meios usados, quais são os componentes utilizados como fonte de energia?
- 3- Discutir os seguintes pontos com relação ao ágar-ágar:
 - a) Fonte;
 - b) Composição química;
 - c) Ponto de fusão e solidificação;
 - d) Concentração utilizada;
 - e) Utilização por microrganismos.

Respostas:

4. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

A esterilização e a desinfecção, as quais têm como objetivo destruir, inibir ou remover microrganismos de materiais, são realizadas há milhares de anos, mesmo antes de estudar os microrganismos.

Essas operações permitem inativar todas as formas vivas de um material ou ambiente e podem ser efetuadas por meio de vários processos: Calor úmido; Calor seco; Irradiação; Filtração; Substâncias químicas.

→ **Esterilização** - processo pelo qual se visa eliminar, por remoção ou morte, todos os microrganismos de um material ou meio, incluindo esporos. É fundamental em todos os procedimentos microbiológicos. Os materiais, a água e os vasilhames utilizados na preparação de meios de cultura e soluções nutritivas para o crescimento de microrganismos devem estar isentos de qualquer forma de vida. Portanto os termos estéril, esterilizar e esterilização referem-se à ausência total ou à destruição total de todos os microrganismos (não existe ambiente “quase” estéril).

→ **Desinfecção** - tratamento de objetos inanimados (utensílios, equipamentos, paredes, chão, mesas) com agente químico de forma a destruir todas as formas vegetativas de microrganismos patogênicos, mas não necessariamente formas esporuladas.

→ **Assepsia** - conjunto de processos (técnicas) utilizados para impedir a entrada de microrganismos em local que não os contenha.

Métodos de esterilização; desinfecção e assepsia.

1 - Agentes Físicos:

a) Calor: O uso do calor (aumento da temperatura), como forma de esterilização, foi o ponto determinante na caracterização dos microrganismos. Desde o século XVII até hoje, é o método mais viável no controle dos seres microscópicos.

Para a esterilização, pode-se utilizar o calor úmido, calor seco, incineração e a flambagem.

Calor úmido: utilizado principalmente para esterilização de meios de cultura, em que os microrganismos são eliminados pela combinação de temperatura, umidade e pressão em **Autoclave**, vapor d'água em torno de 121 °C (15 libras de pressão) é eficiente em um tempo de 15 a 30 minutos, dependendo do material utilizado.

A autoclave pode ser cilíndrica ou cúbica, horizontal ou vertical, dotada com um dispositivo elétrico ou gás, que permita o aumento simultâneo da temperatura e pressão. O calor úmido inativa os microrganismos pela coagulação das proteínas vitais e é um processo muito mais eficiente que o calor seco, porque a água tem maior condutibilidade térmica que o ar.

O procedimento do funcionamento da autoclave baseia-se em uma câmara de parede dupla da autoclave que é primeiramente preenchida com vapor fluente para remover todo o ar, depois é preenchida com vapor puro e mantida a temperatura 121°C e 1 atm de pressão por um período específico. Para a autoclavagem ser executada com sucesso, é essencial que todo o ar residual inicialmente presente na câmara seja completamente substituído por vapor d'água - se o ar estiver presente reduzirá a temperatura interna da autoclave.

Água fervente ou Fervura e Vapor Fluente: chega ao ponto de ebulição, matando os microrganismos na fase vegetativa presente no líquido. A água em ebulição não é considerada como um método de esterilização, uma vez que alguns materiais e objetos não conseguem ser esterilizados com segurança, pois alguns endósporos podem suportar temperaturas acima de 100 °C por mais de uma hora.

Pasteurização: método criado em 1864, levando o nome do microbiologista francês que o criou, Louis Pasteur. É o processo utilizado para esterilização de materiais líquidos e consiste em expô-los a uma temperatura inferior a seu ponto de ebulição e submetê-los, em seguida, a um resfriamento súbito, a fim de eliminar certos microrganismos.

Tindalização ou esterilização fracionada: Método descrito por John Tyndall, físico irlandês (1820-1893), que consiste na exposição ao vapor de água à temperatura de 100-120 °C, repetido com intervalo adequado (12 às 24h). O calor úmido à temperatura de 100°C é insuficiente para a esterilização, pois não é capaz de destruir os esporos. Repetindo-se o aquecimento 2 ou 3 dias consecutivos, com períodos de resfriamento entre eles, consegue-se destruir todas as bactérias. No primeiro aquecimento destrói-se as formas vegetativas; no segundo aquecimento há morte das formas vegetativas dos esporos poupados no primeiro aquecimento ou que germinaram no intervalo e no terceiro aquecimento há morte de formas vegetativas que ainda sobreviveram após o segundo aquecimento.

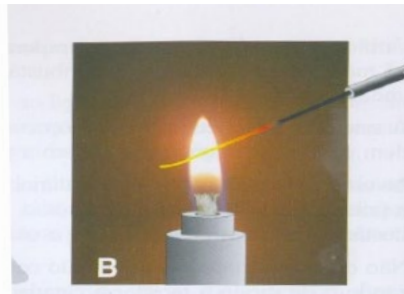
Tipos de tratamento por calor úmido:

Autoclavagem	121°C/15 min
Fervura	100°C
Vapor fluente	100°C
Pasteurização	Lenta – 65°C por 30 min Rápida - 72°C a 75°C por 15 a 20 seg.
Tindalização	30 min/ 3 dias a 100 - 120 °C

- **Calor seco:** é o processo de esterilização por elevação da temperatura em ambiente com umidade extremamente baixa. É utilizada para vidraria e utensílios resistentes a altas temperaturas, entre 160 a 180° C, por um período de 1 a 2 horas. O equipamento utilizado é a estufa esterilizadora. Nesse processo, os microrganismos são inativados pela oxidação dos componentes celulares, sendo as células vegetativas mais sensíveis ao calor do que as formas esporuladas. Existem materiais que não podem ser esterilizados utilizando o calor úmido por várias razões e, nesses casos, o calor seco é o preferido.

Para evitar contaminação após a esterilização das placas e pipetas, estas são previamente embaladas em papel craft (Aula de Acondicionamento de vidrarias). As pipetas podem, ainda, ser esterilizadas dentro de garrafas metálicas próprias para essa finalidade e armazenadas por vários meses em ambiente seco.

a) Flambagem: é uma prática de rotina, principalmente utilizando o bico de Bunsen ou lamparina (A), para alças ou agulhas diretamente sobre o fogo (B), também oxida todo o material até virar cinzas.



Fonte: Alfenas e Máfia, 2016.

b) Radiações: O material a ser esterilizado é submetido à ação de radiação ionizante (raios X, dd) e não-ionizantes (ultravioleta-UV), ou seja, uma energia na forma de ondas eletromagnéticas transmitidas através do espaço ou através de um material.

A luz UV compreende comprimentos de onda entre 150 a 390 °A e é utilizada para esterilização de ambientes e superfícies, devido a seu baixo poder de penetração. A luz UV é absorvida por muitas substâncias celulares, mas de modo mais significativo pelos ácidos nucleicos.

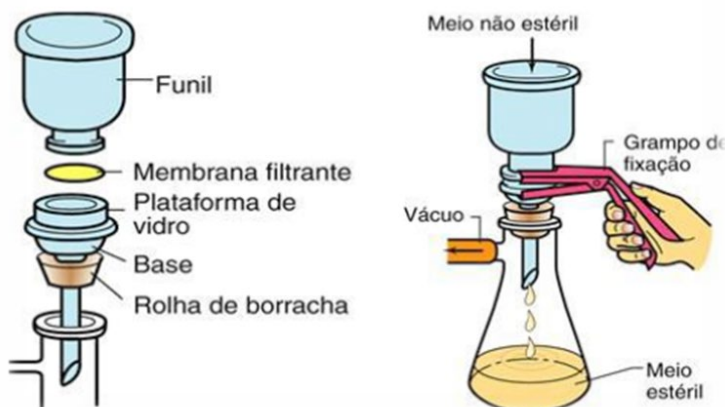
Câmara de fluxo laminar com UV



Fonte: Schwan-Estrada (2018)

As Radiações Gama (δ) são de alta energia, emitidas por certos isótopos radioativos, como o ^{60}Co . Os raios gama possuem alta capacidade de penetração, sendo letais para todas as formas de vida, incluindo os microrganismos. Essa técnica é normalmente utilizada na esterilização de materiais espessos ou volumosos (alimentos empacotados) e é restrita aos grandes centros de pesquisas ou indústrias especializadas.

c) Filtração: Normalmente utilizada para esterilização de meios líquidos com componentes sensíveis ao calor (proteínas, aminoácidos, antibióticos, vitaminas, óleos). A esterilização é para remoção dos microrganismos. Os filtros mais usados são: porcelana, cerâmica, papel celulose e filtros de membrana (éster de celulose).



Fonte: Madigan, Martinko & Parker, 2004, s/p.

2- Agentes Químicos:

Produtos usados na forma de solução visando à desinfecção de materiais ou ambientes (salas cirúrgicas, câmaras assépticas, bancadas de laboratório). Ex. Álcool (70%), fenóis (ácido carbórico, ácido fênico); oxidantes (água oxigenada, hipoclorito de sódio); metais pesados, como mercúrio e sulfato de cobre; gases ou vapores (formaldeído, brometo de etila etc.).

Não existe um composto químico que seja ideal para todos os propósitos, desse modo, é importante conhecer algumas propriedades para que possa escolher o composto mais adequado.

Exercício Prático

Materiais:

- solo fértil, peneirado;
- água esterilizada 90 mL;
- pipeta esterilizada 1 mL;
- 4 tubos com caldo nutritivo;
- autoclave;
- banho-maria a 60°C.

Procedimento:

- 1- Pesar 10 g de solo
- 2- Colocar o solo em 90 mL de H₂O esterilizada. Agitar bem por 5 minutos e deixar em repouso (10') para decantar as partículas maiores.
- 3- Adicionar, assepticamente, 1 mL de suspensão a cada tubo com o caldo nutriente e marcá-lo para os seguintes tratamentos:
 - Tubo 1 – Controle: sem aquecimento;
 - Tubo 2 – Fervura por 30 min (100 °C). Esfriar o tubo em gelo + água;
 - Tubo 3 - Autoclave a 1 atm de pressão, 121°C por 20 min.
- 4- Incubar todos os tubos a 30 °C por 24 a 48 horas.

Examinar os tubos, comparando a intensidade do crescimento pela turbidez. Anotar no quadro os resultados obtidos.

Tubos (nº)	Tratamentos	Crescimento microbiano		
		Dia 01	Dia 02	Dia 03
1	Controle			
2	100 °C + resfriamento em gelo			
3	121°C			

(-) límpido.

(+) intensidade de turbidez: + pouco turvo; ++ médio; +++ altamente turvo.

Questões:

Por que a esterilização por calor úmido é mais eficiente que a do calor seco?

Como a presença do ar no interior da autoclave afeta a temperatura, a uma dada pressão?

Diferenciar Tindalização, Pasteurização e Solarização.

Fazer um esquema da autoclave existente no laboratório e assinalar todas suas partes com legenda adequada.

Completar o quadro:

Esterilização		
	Calor úmido	Calor seco
Temperatura utilizada para esterilização		
Tempo médio para esterilização		
Materiais que podem ser esterilizados		

5. ISOLAMENTO DE CULTURA PURA

No meio ambiente, os microrganismos normalmente crescem em complexas populações que contém várias espécies. Quando os microrganismos crescem em meios de cultivo artificiais em laboratório, a massa celular obtida é denominada de **cultura**. Quando o meio contém duas ou mais espécies de microrganismos, a cultura é denominada de **cultura mista**. Uma determinada espécie de microrganismo só pode ser estudada devidamente se for uma **cultura pura**, isto é, todas as células na população são idênticas, pois se originaram de uma mesma célula mãe (parental), porém, não necessariamente, podem ser geneticamente idênticas, assim essa cultura é axênica. Esses microrganismos assim obtidos são utilizados para estudos morfológicos e fisiológicos.

Na execução, é muito raro, quase que impossível para alguns gêneros, manter uma cultura pura, como por exemplo, as mutações que ocorrem na população de bactérias. Assim, normalmente uma cultura inicialmente pode ser pura, mas ao final do tempo de crescimento, torna-se cultura axênica.

Apesar disso, é comum referir-se a esses tipos de culturas como sendo puras, pelo fato de que, no início, foram obtidas a partir de uma única célula, mas os estudos microbiológicos e suas aplicações são efetuados com a população dos microrganismos e não com uma única célula.

O isolamento de uma cultura pura consiste na separação, a partir de uma amostra mista em espécies individualizadas. Existem várias maneiras de se preparar culturas puras, utilizando-se meios de cultura líquidos ou meios sólidos.

As técnicas mais comumente empregadas são: **esgotamento em meio líquido (diluição em série); método de estrias; semeadura em superfície e “pour-plate”**.

a) Isolamento em meio líquido – diluição em série

Normalmente, a técnica empregada é a de esgotamento por **diluições sucessivas** da suspensão microbiana em volumes conhecidos de meio líquido, de tal maneira que a espécie, cujas células, que se encontrem em maior número, permaneça nas diluições onde as outras já se esgotaram.

É uma técnica trabalhosa e demorada.

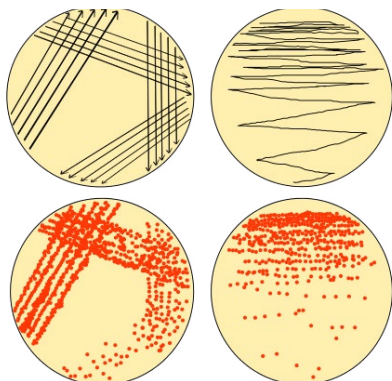
b) Isolamento em meio sólido

É o mais usado e baseia-se no princípio de que quando se espalha uma quantidade suficientemente pequena de material, pode-se obter células individuais que crescem em colônias completamente separadas umas das outras, permitindo que o crescimento de uma célula não interfira com a outra.

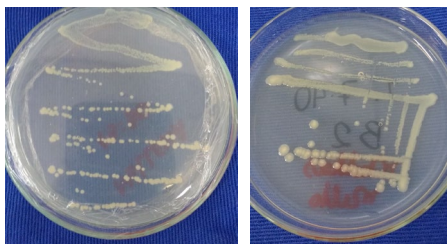
As técnicas utilizadas são:

- a) **esgotamento em superfície** utilizando-se o método de **estrias**;
- b) **derramamento ou mistura** (“pour-plate”).

O isolamento com esgotamento do inóculo ou **em superfície (estrias)** é o processo mais usado e consiste em esgotar uma pequena amostra da cultura mista, por meio do processo de estrias feitas com alça de repicagem. As estrias podem ser do tipo compostas (séries de listas paralelas) ou zig-zag (simples).



Fonte: Colella (2013)



Fonte: Schwan-Estrada, 2018.

Estrias compostas

Estrias simples (zig-zag)

No isolamento em mistura (“**pour-plate**”), a amostra é diluída em tubos com Agar liquefeito que é então derramado em placas que contém Agar-nutriente solidificado e, após solidificação, é incubado. Essa técnica é recomendada para isolamento de microrganismos extremamente móveis ou quando há suspeita de microrganismo anaeróbico.

Exercício Prático

Materiais:

- Suspensão bacteriana;
- Agar nutritivo em placas;
- Tubo com caldo nutritivo;
- Álcool absoluto comercial;
- Alça de repicagem;

Procedimento:

1 - Estrias Simples

- a) Retirar uma gota de suspensão bacteriana com alça de repicagem estéril;
- b) Fazer estria (zig-zag) contínua na superfície do meio de cultura.



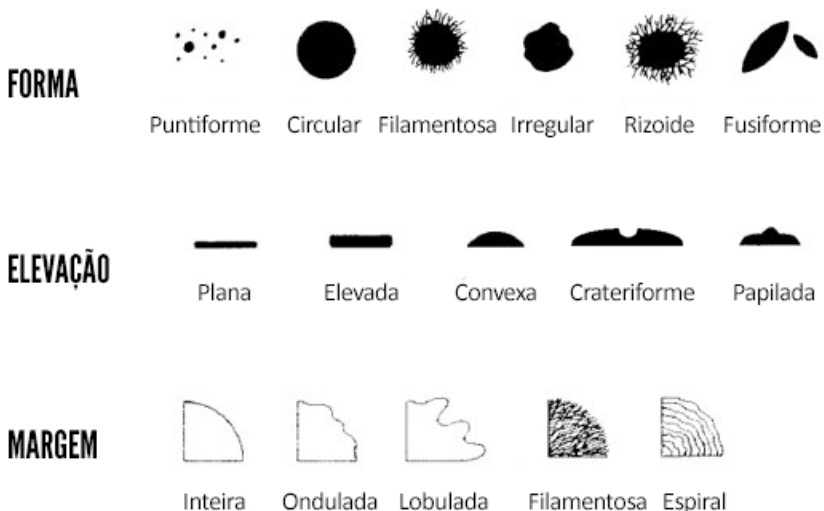
Como isolar colônias através da técnica de estriamento

2 - Estrias compostas

- a) Retirar uma gota de suspensão bacteriana com alça de repicagem estéril;
- b) Fazer de 3 a 4 estrias paralelas na superfície do meio de cultura da placa mãe, espaçadas de 0,5 cm;
- c) Flambar a alça;
- d) Fazer mais 3 ou 4 estrias paralelas, cortando perpendicularmente as anteriores, partindo da primeira estria;
- e) Novamente flambar a alça e fazer mais 3 ou 4 estrias cortando perpendicularmente as anteriores;
- f) Incubar todas as placas a 37 °C por 24 a 48 horas em posição invertida.

Após a incubação, examinar as colônias, inicialmente à vista desarmada e, em seguida, com objetiva de pequeno aumento, sem remover a tampa da placa.

Baseando-se nas características culturais, anotar: a cor da colônia, formato dos bordos, elevação e tamanho.



Fonte: Silva e Batista et al (2016)

Questões:

- 1) Por que se devem incubar as placas de Petri em posição invertida?
- 2) Por que se prefere o meio sólido para isolamento de bactérias?

6. PREPARAÇÕES MICROSCÓPICAS

Para a visualização da maioria dos microrganismos é necessário colocá-los em condições de serem observados ao microscópio. Nas observações microscópicas, o tipo de preparo deve ser de acordo com o interesse a que se destina a observação: se for para visualizar os caracteres morfológicos, certos detalhes de estrutura celular, alguma função fisiológica na célula, etc. Portanto são várias as técnicas utilizadas para a observação de microrganismos. Essas preparações podem ser simples (a fresco sem coloração) até as que exigem mais cuidados na montagem, como nos casos de preparações fixadas e coradas.

As preparações a fresco são:

a) Sem coloração

- **Entre lâminas e lamínulas:** em uma lâmina limpa, colocar uma gota do material a ser observado e cobrir com lamínula. Se o material ainda não estiver em suspensão, colocar primeiro uma gota de água e, em seguida, com a alça de repicagem, colocar uma pequena quantidade do material e cobrir com lamínula.

- **“gota pendente”:**

- **micro cultivo:** o microrganismo é cultivado em um pequeno pedaço de meio de cultura (normalmente BDA) e colocado em uma lâmina limpa e coberto com lamínula. O conjunto (lâmina + BDA com microrganismo + lamínula) é, então, depositado em câmara úmida e incubado por, aproximadamente, 7 dias.

b) Com coloração

Os corantes podem facilitar a observação tornando a célula mais visível. Em preparações a fresco **entre lâminas e lamínulas**, geralmente são utilizados corantes vitais que não comprometem a vitalidade das células, sendo destituídos de ação tóxica. Utilizado, principalmente, para observação de estruturas fúngicas.

Preparações fixadas e coradas

São preparações utilizadas na verificação das características morfológicas das bactérias. As etapas essenciais nesta preparação são:

1- Preparo do **esfregaço**: com a alça de platina, coletar uma amostra da suspensão bacteriana e esfregá-lo (espalhar) no centro de uma lâmina limpa e flambada;

2- **Fixação**: após o esfregaço, a fixação é feita passando a lâmina três vezes diretamente sobre a chama do bico de Bunsen;

3- **Coloração**: a coloração pode ser **simples** (direta ou indireta) ou **diferencial**.

Coloração simples direta: o esfregaço fixado é corado utilizando-se apenas um tipo de corante (cristal violeta ou fucsina). Nesse tipo de coloração, a bactéria adquire a cor do corante e contrasta com o fundo claro (transparente) da lâmina.

Coloração simples indireta: é também denominada de coloração negativa; o esfregaço fixado é coberto com uma fina camada de tinta da China ou nanquim. Nessa coloração, a bactéria permanece incolor e contrasta com o fundo escuro da lâmina.

Coloração diferencial: a coloração é realizada com a aplicação de mais de uma solução corante. Ex: coloração de Gram; coloração de esporos bacterianos; coloração de flagelos etc.

Exercício Prático

Materiais:

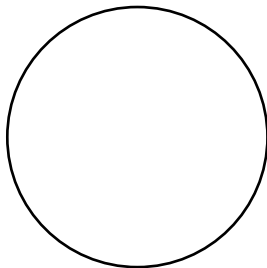
- lâminas e lamínulas;
- corantes: azul de metileno; cristal violeta; nigrosina;
- culturas bacterianas e fúngicas.

Preparar, observar e esquematizar: - bactérias: fixada e corada simples direta e indireta.

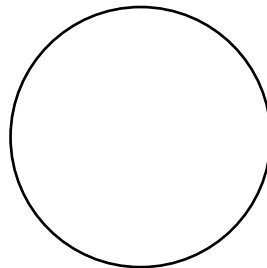
Procedimento (fixada e corada simples direta):

- Retirar, com auxílio de uma alça de platina e/ou agulha flambada e fria, uma gota da cultura bacteriana;
- Espalhar, uniformemente, a gota em lâmina limpa e logo em seguida fazer o esfregaço;
- Flambar a alça de platina e/ou agulha e recolocá-la no suporte;
- Deixar o esfregaço secar ao ar e fixá-lo pela passagem rápida da face da lâmina sobre a chama, por 2 ou 3 vezes;
- Cobrir todo o esfregaço com uma solução corante por 1 minuto;
- Escorrer o excesso de corante, lavar cuidadosamente com água e deixar o esfregaço secar ao ar;
- Examinar a preparação da objetiva de imersão (alta luminosidade).

Desenhar os vários microrganismos observados. Anotar as formas, agrupamentos e tamanho relativo dos microrganismos presentes.



Aumento:



Aumento:

Questões:

- 1) Citar os diferentes tipos de preparações microscópicas mostrando a sua aplicação usual.
- 2) Enumerar as estruturas e funções fisiológicas que podem ser evidenciadas por meio das preparações microscópicas com o uso de corantes.
- 3) Explicar a utilização do micro cultivo. **Esquematizar** as etapas de preparo explicando o objetivo de cada uma delas.

7. COLORAÇÃO DE GRAM

As bactérias Gram positivas retêm o cristal violeta, apresentando a coloração roxa, e as bactérias Gram negativas perdem o cristal violeta e são coradas com o corante de contraste (Fucsina ou Safranina), tomando a cor rosa ou avermelhada.

A característica de Gram positividade está correlacionada com outras características das células e pode ser afetada pelos fatores que, em alguma extensão, condicionam o estado fisiológico da célula com composição do meio de cultura, a idade da célula etc.

Exercício Prático:

Materiais:

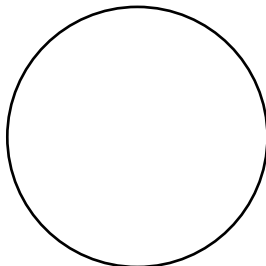
- suspensão bacteriana com 24 h em caldo nutriente;
- lâminas;
- cristal violeta, lugol, álcool e safranina.

Procedimento:

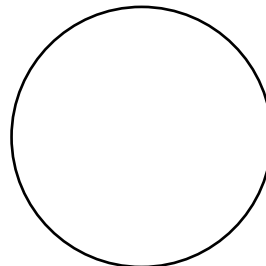
- a) Retirar, com auxílio de uma alça de platina flambada e fria, uma gota da cultura bacteriana;
- b) **Espalhar**, uniformemente o material na lâmina limpa e flambada;
- c) Flambar a alça de platina e colocá-la no suporte;
- d) Deixar o esfregaço secar ao ar, **fixá-lo** pela passagem rápida da face oposta da lâmina sobre a chama, por 2 a 3 vezes.

- e) Cobrir todo o esfregaço com uma solução de **crystal violeta** por 1 min;
- f) Escorrer o excesso de corante, lavar cuidadosamente com água, drenando o excesso;
- g) Aplicar a solução de **lugol** por 2 minutos, escorrer o excesso e lavar com água;
- h) Descorar com **álcool**, adicionando-o em gotas rápidas cuidadosamente. Lavar com água;
- i) Cobrir o esfregaço com **safranina** ou fucsina por 30 ou 60 segundos, escorrer o excesso, lavar com água e secar ao ar;
- j) Examinar com objetiva de imersão;
- k) Usar o mesmo procedimento para cada cultura dada.

Desenhar as estruturas observadas e anotar as formas, tamanho relativo e o resultado do teste diferencial.



Aumento



Aumento

Questões:

- 1) Quais os fatores que afetam o Gram positividade das células?
- 2) O que distingue uma técnica de coloração simples de uma diferencial?
- 3) Que generalizações podem ser feitas quanto à composição química das células Gram positivas e Gram negativas?
- 4) Dê três exemplos de gêneros diferentes que sejam Gram positivas e três Gram negativas.

8. ISOLAMENTO DE *Azotobacter*

O gênero *Azotobacter* foi inicialmente descrito por Martinus Beijerinck, em 1901, com a espécie *A. chroococcum*. São células pleomórficas, ou seja, alteram de forma com a idade; as células jovens apresentam-se como bastonetes móveis e, com o tempo, perdem a motilidade e tornam-se cocóides. Observa-se, ainda, o acúmulo de grânulos citoplasmáticos com a produção de grande quantidade de substância extracelular mucóide. Em meio sólido, formam colônias mucosas. Com o tempo, essas colônias tornam-se pigmentadas, o que constitui um caráter taxonômico.

Uma das características fisiológicas de *Azotobacter* é a sua alta taxa respiratória, o que se traduz em uma alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Desempenham um importante papel no ciclo do nitrogênio na natureza; capta nitrogênio atmosférico, que é inacessível às plantas, e liberta-o em forma de íons amônio no solo. As fontes de nitrogênio podem ser nitratos, íons amônio ou aminoácidos, podendo fixar pelo menos 10 µg de nitrogênio por grama de glicose consumida.

Em meios com grande disponibilidade de carboidratos, álcoois e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, a sua vantagem seletiva é notável em relação aos demais microrganismos. .

Geralmente, *Azotobacter* requer pH mais elevado para seu crescimento (7,0 até 7,5), mas o crescimento é mantido no intervalo de pH entre 4,8 e 8,5, bem como uma boa disponibilidade de P, Ca, Mg e Mo. Ainda, para essa fixação do nitrogênio, necessita de íons molibdênio, mas podem ser parcialmente substituídos por íons vanádio ou mesmo de ambos. Assim a ocorrência natural de *Azotobacter* é restrita àqueles solos com boa fertilidade.

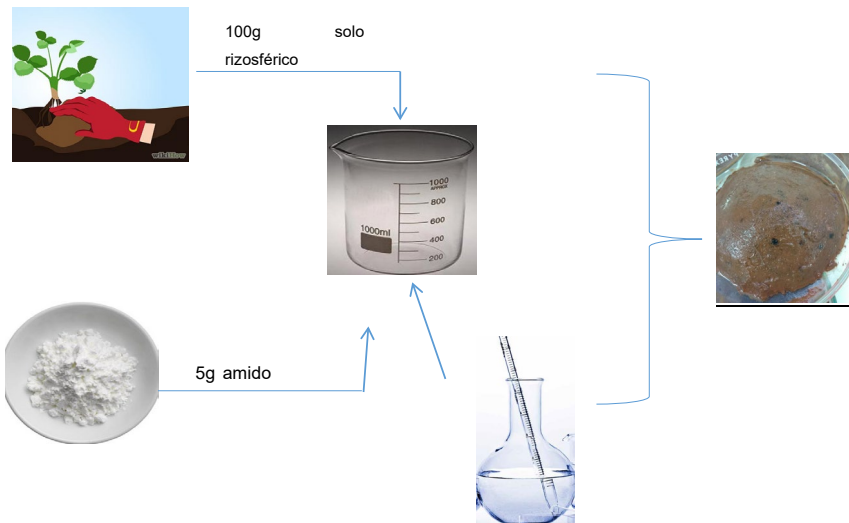
Além da fixação assimbiótica do nitrogênio, *Azotobacter* também sintetiza algumas substâncias biologicamente ativas; entre elas fito hormônios, como as auxinas que são estimulantes do crescimento das plantas. Também facilitam a mobilidade de metais pesados no solo e assim podem potencializar a biorremediação da contaminação por metais pesados do solo, como o cádmio, mercúrio e chumbo. Alguns tipos de *Azotobacter* podem biodegradar compostos aromáticos que contenham cloro, como o 2, 4,6-triclorofenol. Esse composto foi inicialmente usado como inseticida fungicida e herbicida, mas depois se descobriu que tinha efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

Materiais:

- Amostras de solo;
- Amido em pó;
- Placas de Petri;
- Espátulas;

Procedimento:

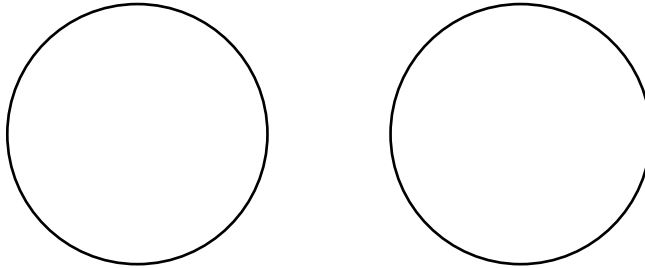
1. Pesar 100 g de solo e enriquecê-lo com adição de 5 g de amido. Misturar bem o solo e o amido;
2. Umedecer o solo enriquecido com água, até obter uma consistência pastosa;
3. Colocar uma porção dessa pasta em placa de Petri e, com auxílio de espátula, moldar uma superfície convexa e espalhada;
4. Rotular e incubar de 7-15 dias. Examinar as placas. O crescimento de *Azotobacter* é característico, formando colônias escuras na superfície da pasta de terra.



Fonte: Schwan-Estrada, 2018 (compilado).

Resultado:

Desenhar células de *Azotobacter* observadas ao microscópio.



Aumento:

Aumento:

Questões:

- 1) O que dizer sobre fixação assimbiótica de nitrogênio?
- 2) Citar ao menos 3 microrganismos capazes de fixar o nitrogênio de forma assimbiótica.
- 3) Qual a função do amido que é adicionado ao solo na técnica para isolamento de *Azotobacter*?
- 4) Por que o *Azotobacter* cresce na superfície da pasta de solo e não em seu interior?
- 5) Qual a característica principal que deve ter um meio de cultura específico para isolamento de fixadores de nitrogênio?

9. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS - PROVAS BIOQUÍMICAS

Existem muitas espécies bacterianas descritas, mas a identificação é dificultada pela pequena variação de forma que elas apresentam, exigindo, por esta razão, o estudo de características culturais das atividades fisiológicas e de características tintoriais da célula. Já as provas bioquímicas utilizam meios de cultura e reagentes específicos para detectar metabólitos resultantes da atividade bacteriana, auxiliando na sua identificação.

Nas características culturais, determina-se o aspecto, forma, cor e tamanho das colônias. Nas características tintoriais, determina-se usando diferentes colorações. Nas características bioquímicas, são estudadas por

meio de testes que mostram as transformações metabólicas realizadas pelos microrganismos.

Principais provas bioquímicas:

- 1) Produção de acetilmetilcarbinol - Teste de Voges Proskauer (VP).
- 2) Produção de catalase.
- 3) Prova do vermelho de metila (VM).
- 4) Redução do azul de metileno.
- 5) Produção de gelatinase.
- 6) Produção de amilase
- 7) Produção de indol.
- 8) Fermentação de açúcares.

1 - Produção de acetilmetilcarbinol - Teste de Voges Proskauer.

Alguns microrganismos fermentam glicose produzindo, entre outros compostos, o acetilmetilcarbinol (acetoína), butilenoglicol e pequenas quantidades de ácidos carboxílicos. Detecta-se o composto acetoína adicionando hidróxido de potássio (KOH) ao meio.

O acetilmetilcarbinol em presença de KOH e do ar é oxidado, formando diacetila. Com a adição de alfa-naftol ocorre a catálise, que, em presença de peptona, dá uma coloração vermelha, enquanto uma cor amarela indica um resultado negativo.

Para o teste de VP, as bactérias são inoculadas em meio Clark e após crescimento são adicionados os reagentes de Barrit I e II:

I = 5 mL de α naftol e 95 mL de álcool etílico absoluto.

II = 40 g de KOH e água destilada até completar 100 mL.

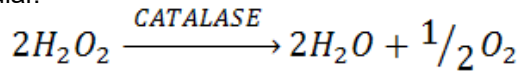
Resultado: positivo.....coloração vermelha

negativo.....coloração amarela

2 - Produção de Catalase

Certas bactérias produzem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em presença de oxigênio livre. O acúmulo de peróxido é controlado por: catalase bacteriana e grau de sensibilidade.

A catalase é uma enzima capaz de decompor o H_2O_2 formando água e oxigênio molecular.



Para o teste, as bactérias são inoculadas em meio de cultura líquida e após crescimento é adicionada algumas gotas de água oxigenada.

Resultado: positivo.....desprendimento de bolhas de ar
 negativo.....ausência de bolhas de ar

3 - Prova do Vermelho de Metila (VM)

Algumas bactérias fermentam a glicose com produção de ácido, até que o pH do meio chegue à cerca de 5,0. Essa prova tem como objetivo determinar a capacidade dos microrganismos para oxidar a glicose com produção e manutenção de concentrações altas de produtos finais ácidos.

Para o teste do VM, as bactérias são inoculadas em meio de cultura Clark e após o crescimento é adicionado um indicador de acidez, o vermelho de metila, que detecta a presença de grandes concentrações de produtos finais ácidos, pois tem um ponto de viragem baixo.

Resultado: positivo.....coloração vermelha
 negativo.....coloração amarela
 duvidoso.....coloração intermediária

4 - Redução do Azul de Metileno

Azul de metileno, quando introduzido numa cultura bacteriana, comporta-se como um pigmento respiratório, isto é, age como aceptor de hidrogênio, ocasionando uma oxidação intracelular em condições de anaerobiose. Ao mesmo tempo, o corante torna-se incolor. A descoloração do corante se dá em razão do consumo de oxigênio pelas bactérias em crescimento.

Resultado:
 positivo.....meio completamente claro, exceto na parte superior do meio
 negativo.....meio com a coloração azul inicial.



Fonte: Schwan-Estrada, 2018.

5 - Produção de Gelatinase

Certas bactérias elaboram uma enzima extracelular que tem a propriedade de hidrolisar a gelatina: gelatinase. Demonstra-se a presença de gelatinase inoculando o meio com gelatina como agente solidificante. Após incubação, verificar se a gelatina foi hidrolisada, deixando, se necessário, o meio em água fria ou geladeira.

Resultado: positivo.....se o meio ficar líquido
negativo.....se o meio ficar sólido

6 - Produção de Amilase

A amilase é uma enzima extracelular que tem função catalisadora, que hidrolisa o amido em glicose, e pode ser sintetizada por algumas bactérias. Para a visualização da hidrólise do amido, a bactéria é cultivada em meio sólido contendo amido, em placas de Petri, e após o crescimento, cobre-se a superfície das colônias com solução saturada de iodo ou lugol.

Resultado:

positivopresença de zonas claras em torno do crescimento da bactéria.

negativo.....todo o meio fica azul.



Fonte: Schwan-Estrada, 2018.

7 - Produção de Indol

Algumas bactérias produzem a enzima triptofanase que atua sobre o triptofano e libera o indol. Existem várias técnicas para detectar presença de indol, entre elas a técnica de Gnezda. Para esse teste, o microrganismo é inoculado em meio rico em triptofano. São preparadas tiras de papel impregnado com solução saturada de ácido oxálico. A tira de papel é colocada suspensa dentro do tubo, segurada pelo tampão de algodão e os tubos são incubados.

Resultado:

positivotira de papel fica com coloração rósea avermelhada.

negativo.....branco.

8 - Fermentação de açúcares

Os carboidratos podem ser fermentados pelas bactérias com formação de ácidos e gás. Esses ácidos acumulam-se no meio de cultura e baixam gradativamente o pH. A verificação da acidez pode ser feita pela adição de indicadores ao meio, como, por exemplo, o indicador de Andrade, que passa da cor rósea para a avermelhada à medida que a acidez do meio aumenta. Em meios líquidos, verifica-se a produção de gás com tubos de Durhan.

Geralmente, são testados diferentes açúcares e verificada a capacidade do microrganismo em formar ácido e gás.

Exercício Prático

Materiais:

- Cultura pura de bactéria;
- Placa com ágar-amido,
- Alça de repicagem;
- Tubo contendo gelatina, Azul de Metileno
- Água oxigenada;

Procedimento:

1- Inocular todos os tubos com diferentes meios de cultura usando a alça de repicagem.

2- Fazer a inoculação em Placa de ágar-amido, pelo processo de estrias simples.

3- Com a alça de repicagem, inocular o tubo contendo gelatina, fazendo uma picada no meio de cultura.

4- Incubar todos os tubos a 37 °C por 16 a 72 horas.

Fazer as diversas observações conforme recomendação do instrutor.

Identificar a espécie bacteriana por comparação com os dados fornecidos pelo instrutor.

Questões:

- 1) Explique o princípio da prova de redução do Azul de Metileno.
- 2) Todas as bactérias apresentam motilidade? Como é produzido o movimento bacteriano?
- 3) O que é solução de lugol? Qual a reação entre o lugol e amido?

Principais Provas Bioquímicas empregadas na identificação das bactérias

Nome da prova	Metabolismo explorado	Tipo de reação	Substrato	Reação	Produto final
Produção de Indol	Nitrogenado	Mista (hidrólise e desmólise)	Triptofano	Complexa	Indol
Produção de H ₂ S	Nitrogenado	Mista (hidrólise e desmólise)	Cistina e Cisteína	Complexa	H ₂ S
Hidrólise da gelatina (liquefação)	Nitrogenado (Protéico)	Hidrólise	Gelatina	Hidrólise dando próteses, peptonas etc.	Proteoses, peptonas, etc.
Hidrólise de caseína	Nitrogenado (Protéico)	Hidrólise	Caseína	Hidrólise dando próteses, peptonas etc.	Proteoses, peptonas, etc.
Prod. Amônia	Nitrogenado	Mista (hidrólise e desmólise)	Amonia ácidos	Desaminação	Amônia
Hidrólise do amido	Carboidrato	Hidrólise	Amido	Amido > Dextrina + maltose	Maltose
Prova do vermelho de metila	Carboidrato	Desmólise	Glicose	Forma ácidos pela fermentação de glicose	Ácidos
Prova de V P	Carboidrato	Desmólise	Glicose	Acetil metil	Acetona
Redução do azul de metileno	Respiratório (óxido-redução)	Desmólise	Doadores de H ₂ constituintes do meio	Transferência do H ₂ do sub. P/ MB-aceptor de H ₂	Azul de metileno sofrendo redução passa a leucoderivado
Produção de catalase	Respiratório	Desmólise	H ₂ O ₂	2 H ₂ O ₂ → 2H ₂ O + ½O ₂	H ₂ O e O ₂

Principais Provas Bioquímicas empregadas na identificação das bactérias (continuação)

Nome da prova	Reativo para detecção do produto final	Enzima responsável	Leitura da prova
Produção de Indol	Ehrlich ou Kovacs (paradimetilaminobenzaldeído)	Complexo enzimático	2-4 dias
Produção de H ₂ S	Acetato de chumbo (sais de metais pesados)	Complexo enzimático	2-3 dias
Hidrólise da gelatina (liquefação)	Não havendo hidrólise, a proteína íntegra é revelada com reativo adequado	Gelatinase	7-14 dias
Hidrólise de caseína	A hidrólise é evidenciada pela classificação do meio em torno das colônias	Casease ou caseinase	2-4 dias
Produção de amônia	Reagente de Nessler	Desaminases	24-48 horas
Hidrólise do amido	Lugol (indica se o amido foi hidrolizado ou não)	Amilases	4-10 dias
Prova do vermelho de metila	Vermelho de metila que indica a queda do pH (coloração vermelha)	Várias	2-7 dias
Prova de V P	Barrit (alfa naftol e KOH)	Várias	24 horas
Redução Do azul de metileno	Reação lida pela descoloração do azul de metileno	Dehidrogenases	24-48 horas
Produção de catalase	A reação é lida pelo borbulhamento do O ₂ que se desprende	Catalase	24-48 horas

Fonte: Cassini (1983)

10. RELAÇÕES INTERESPECÍFICAS

Os microrganismos podem interagir entre si formando relações benéficas ou não. As interações microbianas são:

1- Neutralismo	(0) (0)
2- Comensalismo	(+) (0)
3- Protocooperação	(+) (+)
4- Predação	(+) (-)
5- Competição	(-) (-)
6- Simbiose mutualística	(+) (+)
7- Simbiose antagônica (= parasitismo)	(+) (-)
8- Antagonismo (ou amensalismo)	(-) (0)

Quando o microrganismo interage com outros microrganismos, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes a interação é denominada de **antagonismo**. Em controle biológico, antagonistas são usados como agentes biológicos que interferem no ciclo vital, por exemplo, de fitopatógenos.

Um antagonista pode interagir com seu oponente por meio dos seguintes processos:

- Predação
- Competição
- Parasitismo (simbiose antagônica)
- Antibiose

Predação: É uma relação antagônica em que um organismo (predador) destrói seu oponente (presa) com violência, para então obter seu alimento deste último. É um mecanismo mais frequente entre nematóides, insetos, protozoários e animais, com poucos exemplos entre microrganismos.

Competição: Refere-se à interação de dois microrganismos que “disputam” um recurso ambiental limitado (espaço, nutrientes, oxigênio etc.), muito comum em ecossistemas naturais, onde a competição intra e intergenérica

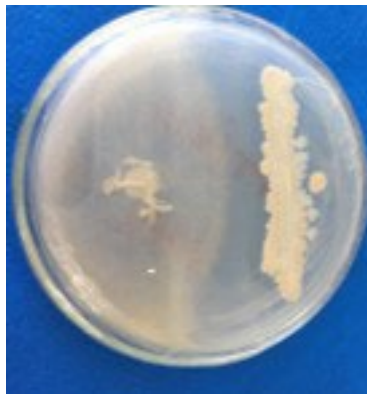
é, em grande parte, responsável pelo equilíbrio populacional de microrganismos. Uma teoria que explica a competição entre seres vivos é o princípio da exclusão competitiva ou princípio de Gause: “se duas espécies possuem nichos ecológicos muito semelhantes, uma severa competição se estabelecerá entre elas e ambas não conseguirão conviver no mesmo habitat”. No controle biológico, como exemplo dessa forma de antagonismo, pode-se citar a competição entre *Pseudomonas fluorescens* e *Fusarium oxysporum* pelo Fe^{++} do solo, essencial ao desenvolvimento de ambos.

Parasitismo: É uma relação antagônica em que um organismo (parasita) vive sobre ou dentro de outro organismo vivo (hospedeiro) obtendo seu alimento deste último, representando uma relação desarmônica, causando-lhe danos de maior ou menor importância, mas raramente a morte. É uma relação comum entre os fungos. Fungos do gênero *Trichoderma* são hiperparasitas de uma série de outros fungos, atuando de maneira eficiente no controle de doenças causadas por fungos do solo.

Exs: *Trichoderma harzianum* x *Sclerotium rolfsi*

Trichoderma harzianum x *Rhizoctonia solani*

Antibiose: refere-se à interação entre organismos, em que um metabólito produzido por um deles tem efeito prejudicial sobre o outro. A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe de contato físico entre os microrganismos. Grande parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua por meio de antibiose.



Fonte: Schwan-Estrada, 2018.

Os microrganismos também se relacionam de maneira harmônica com outros microrganismos (protocooperação) ou com raízes de plantas (simbiose mutualística).

Protocooperação: *Escherichia coli* e *Lactobacillus*

Simbiose mutualística: *Bradyrhizobium* x soja; *Rhizobium* x feijão; micorrizas

Exercício Prático

Material:

- placas de Petri com BDA;
- colônias fúngicas e bacterianas;
- repicador;
- agulha e alça de repicagem;

Repicar os microrganismos disponíveis para as placas de Petri com BDA e incubá-las de três a quatro dias, a 28 °C, no escuro. Observar a formação de halo de inibição.

Questões:

- a) Cite diferentes formas de antagonismo microbiano.
- b) O que é halo de inibição? A que se deve a inibição de crescimento de um microrganismo por outro situado à determinada distância?

11. MICORRIZAS

Micorriza significa “fungo de raiz” (do grego mykes - fungos; rhiza - raiz), é a estrutura resultante da associação simbiótica mutualística entre a raiz de uma planta e certos fungos do solo. “Essa palavra foi usada pela primeira vez por Frank, em 1885, para descrever a associação de raízes de plantas superiores e fungos” (SCHWAN, 1984).

Micorriza = raiz + fungo (ex: *Pisolithus tinctorius* + eucalipto).

As micorrizas são agrupadas de acordo com sua morfoanatomia em ZAMBOLIM; SIQUEIRA (1985):

Ectomicorrizas, em cuja associação os fungos penetram o córtex da raiz intercelularmente, formando uma rede, conhecida como “rede de Harting” e externamente formam um manto de hifas e rizomorfias, com profundas alterações morfoanatômicas na raiz. Ocorrem predominantemente em espécies arbóreas de clima temperado, especialmente coníferas, as quais podem se associar com mais de cinco mil espécies de fungos, na maioria basidiomicotina;

Ectoendomicorrizas são associações similares as ectomicorrizas, mas com penetração intracelular mantendo o manto externo de hifas. Distinguem-se em três tipos, com base no hospedeiro: ectoendomicorrizas de *Pinus*, de arbutoides e de monotropoides. Os microbiontes são, na maioria dos casos, basidiomicetos ectomicorrizicos;

Micorrizas arbusculares (endomicorrizas) são as associações caracterizadas pela penetração inter e intracelular, formando arbuscúlos e vesículas e ausência de manto externo. (ZAMBOLIM; SIQUEIRA, 1985)

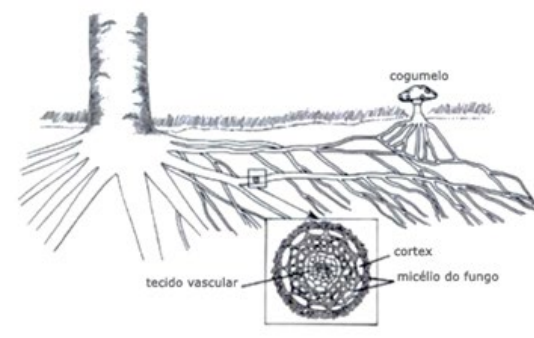
Também ocorrem com três tipos de diferenciações: as **micorrizas ericóides**, associadas a raízes de plantas da ordem ericales e os fungos pertencem aos gêneros *Pezizella* e *Clavaria*; as **orquidóides**, associações entre as orquideaceas e fungos dos gêneros *Rhizoctonia* e *Armillaria* e as **Arbusculares (MA)**, associações de fungos do filo Glomeromycota e a maioria das espécies de plantas vasculares (SOUZA et al, 2006).

O processo de penetração celular das micorrizas arbusculares ocorre pela invaginação do plasmalema de célula radicular do hospedeiro e a hifa penetrante fica totalmente envolvida pela matriz, material originado no fitobionte. Após a penetração, ocorre a diferenciação da hifa intracelular, formando espirais, pelotões, arbuscúlos e vesículas, sendo que estas últimas são

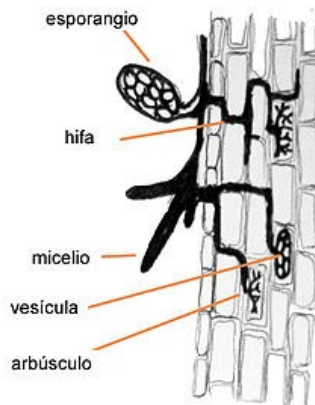
encontradas com maior frequência no interior das células colonizadas pelo fungo (ZAMBOLIM; SIQUEIRA, 1985).

Todas as plantas vivem em associação micorrízica, com exceção de algumas famílias como Crucíferas, Chenopodiaceae e Cyperaceae. Em ecossistemas naturais, isto é, solo não fertilizado, nenhuma planta pode sobreviver sem micorrizas (ZAMBOLIM; SIQUEIRA, 1985).

Ectomicorrizas



Micorriza arbuscular

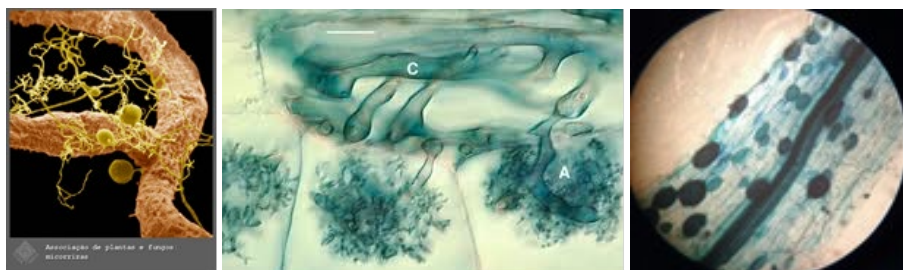


Fonte: Zambolim e Siqueira, 1985.

Tipos de Micorrizas:

a) Micorrizas em plantas de interesse agrônômico (tipo MA).

A associação se caracteriza pela penetração das hifas do fungo no interior da célula hospedeira sob a forma de vesículas e arbúsculos (micorrizas arbusculares).



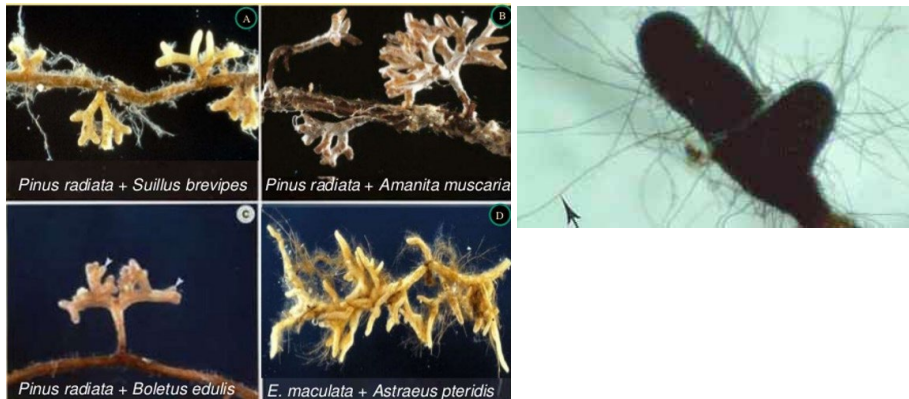
Fonte: <https://mycorrhizas.info/>

b) Micorrizas das essências florestais (ectomicorrizas)

As ectomicorrizas caracterizam-se por formarem manto fúngico, “rede de Hartig”, micélio externo e alteram a morfologia da raiz.

Ex: ectomicorriza em *Pinus*

Ex: *Cenococcum* x *Eucalyptus maculata*



Fonte: <https://www.slideshare.net/Proplant/micorrizas-68120870>

Fonte: <https://mycorrhizas.info/ecm.html>



Fonte: Schwan, 1984.

c) Micorrizas das orquídeas

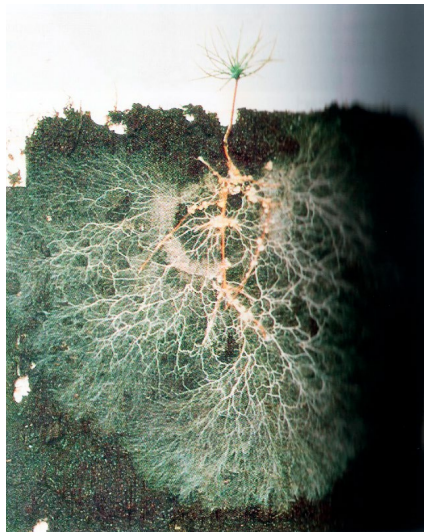
As hifas constituem estruturas especiais (emaranhado de hifas) denominadas peloton no interior das células.

Micorrizas das Ericáceas (rododendron, azáleas, uva do monte, vacínio).

Ocorrem em solos ácidos e trata-se de ectendomicorrizas (combinação de características das ecto e micorrizas arbusculares). Essas micorrizas são caracterizadas por um manto externo e or penetração das hifas no interior das células hospedeiras.

Função das Micorrizas

A associação micorrízica, qualquer que seja sua morfoanatomia, promove o crescimento das plantas, principalmente porque a hifa extramatricial aumenta a absorção de água e nutrientes, especialmente daqueles que se aproximam do sistema radicular por difusão, como o fósforo, o zinco e o cobre; difusividade lenta, por causa do substancial aumento no volume de solo explorado (exemplo abaixo). Essas hifas, associadas com as raízes de plantas colonizadas por este tipo de fungo, além do maior volume de solo explorado promovem uma superfície de absorção muito maior do que são capazes os pelos radiculares nas plantas não micorrizadas (ZAMBOLIM; SIQUEIRA, 1985)



Ectomicorrizas em plântula de *Pinus* com 4cm acima do solo (extraído de Raven *et al* 2001)

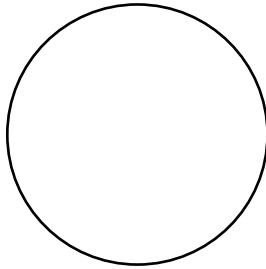


Material:

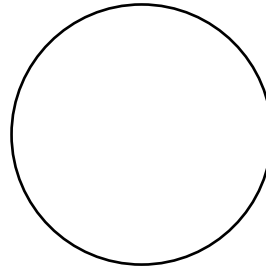
- Lâminas preparadas
- Microscópio

Resultados:

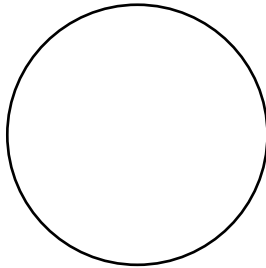
Esquematizar os tipos de micorrizas observadas.



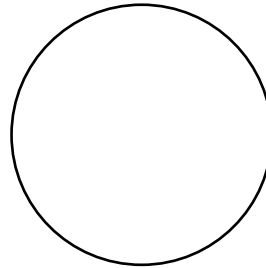
Aumento:



Aumento:



Aumento:



Aumento:

Questões:

- a) O que caracteriza o termo “micorriza”?
- b) Quais os tipos de estruturas associadas às ecto e micorrizas arbusculares? Relatá-las comentando as suas funções.
- c) Citar exemplos de fungos ectomicorrízicos e micorrizas arbusculares

12. ISOLAMENTO DE FUNGOS

Fungos filamentosos raramente ocorrem isolados na natureza, seu habitat natural, obrigando, quando se quer estudar um organismo isoladamente, em algumas vezes até mesmo para identificá-lo, recorrer a técnicas especiais para isolá-lo de outros organismos contaminantes. Denomina-se isolamento a operação de transferência do microrganismo do local onde está, na natureza, a outro meio natural ou artificial que permita estudá-lo na sua forma pura.

Os fungos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, proliferando como saprófitas, parasitas ou como simbioses. São heterotróficos, multicelulares, aeróbios obrigatórios e apresentam reprodução assexuada e sexuada. Como saprófitas contribuem no ciclo de degradação de quase toda matéria orgânica, obtendo assim, carbono e energia necessários ao seu desenvolvimento. Se, por um lado, os fungos saprófitas são úteis na reciclagem da matéria orgânica, por outro, podem causar a deterioração de alimentos, tecidos vegetais e ambientes. Como parasitas causam doenças em vegetais e animais, inclusive o homem. Os fungos podem atuar ainda em associações simbióticas de grande importância, como as associações micorrízicas.

Antes de estudar o efeito do ataque de fungos em materiais diversos, geralmente é necessário isolá-los, tanto para sua identificação como para determinar seus requerimentos nutricionais e seus produtos metabólicos. Os métodos usados para o isolamento de fungos e seu cultivo dependem muito do seu habitat natural.

Para o isolamento de **fungos saprófitas do solo ou de alimentos**, pode-se utilizar os métodos de diluição ou estrias em superfície de meio sólido. Para isolamento de **fungos fitopatogênicos**, os métodos variam de acordo com o fungo e com o tipo de lesão. Na maioria das vezes, o isolamento é feito transferindo-se fragmentos do tecido atacado para um meio de cultura próprio como, por exemplo, o BDA (batata-dextrose-ágar), após desinfecção em álcool e hipoclorito de sódio (figura abaixo). O fitopatógeno encontra-se no interior dos tecidos e não é afetado pelo desinfetante, a menos que o tempo seja longo.

As placas são incubadas a 28 °C e no escuro. O isolamento é feito a partir das placas que apresentarem um número pequeno de colônias dispersas. Após o isolamento, deve-se utilizar o método de repicagem.

Repicagem é um dos métodos de rotina mais utilizado para manutenção de culturas, consiste na transferência do micélio de um meio de cultura, para outro meio igual ou diferente do microrganismo, em novos tubos de ensaio ou placas de Petri. Os tubos e as placas de Petri são incubados a temperatura que favoreça o crescimento do microrganismo até que haja a colonização do meio de cultura. Para evitar contaminações devem-se usar tampões de algodão hidrófobo nos tubos de ensaio; nas placas de Petri, filme plástico.

As repicagens podem induzir o fitopatógeno ao hábito saprofítico, à alteração de sua morfologia, à diminuição e à perda de sua capacidade de esporular e à diminuição de sua agressividade.

Na repicagem devem-se transferir apenas porções jovens e esporulantes da colônia, ou seja, as partes mais externas da colônia.

Material:

- Incubadora;
- Amostra: material vegetal (fitopatógeno); alimento deteriorado;
- Pinça;
- Álcool 70 %;
- Hipoclorito de sódio 0,5%;
- Becker;
- Água destilada previamente esterilizada;
- Estilete, papel de filtro.

Procedimento:

A - Isolamento de fungos saprófitas

1. Recolher com estilete ou alça de platina: esporos ou micélio de fungos contaminando alimentos e outros materiais;
2. Diluir em água esterilizada;
3. Transferir 0,1 mL da suspensão para superfície de BDA;
4. Espalhar o inóculo com alça de Drigalsky;

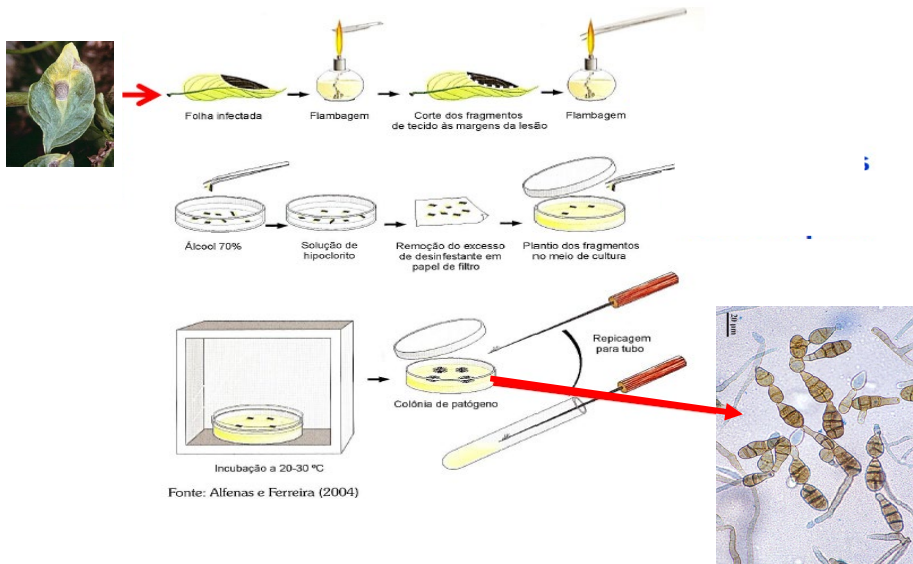
5. Incubar a temperatura ambiente por 7 dias ou tempo suficiente para repicagem para placas de Petri contendo BDA.

Ou

1. Recolher com estilete ou alça de platina: esporos ou micélio de fungos contaminando alimentos e outros materiais. Transferir para placas de Petri contendo ágar-água ou ágar nutriente;
2. Incubar a temperatura ambiente por 7 dias ou tempo suficiente para repicagem para placas de Petri contendo BDA.

B - Isolamento de fungos fitopatogênicos de partes vegetais.

1. Escolher material em que as lesões sejam recentes, para evitar organismos saprófitas;
2. Cortar o material vegetal em quadrados de aproximadamente 0,5 cm, tendo o cuidado de incluir também as partes saudáveis do tecido;
3. Lavar o material em água corrente e secá-lo em papel absorvente;
4. Submergir os fragmentos em álcool 70% por 30 segundos, para quebrar a tensão superficial e iniciar a descontaminação da superfície;
5. Com uma pinça ou estilete flambado transferir os quadrados para solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 30 segundos a 1 minuto;
6. Com uma pinça ou estilete flambado: retirar os fragmentos (4) com uma pinça flambada para a placa de Petri com BDA;
7. Incubar a 25 °C por 7 dias ou tempo suficiente para repicagem para placas de Petri contendo BDA;
8. Fazer a primeira observação após 48 horas de incubação.



Fonte: Alfenas et al., 2007.

Resultados:

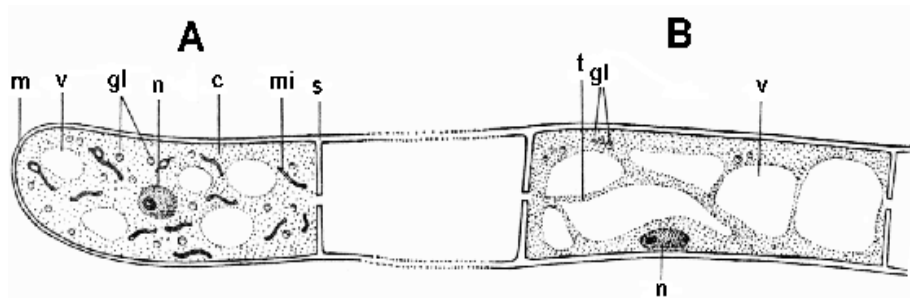
- Esquematizar as colônias fúngicas que foram isoladas.

13. OBSERVAÇÃO DE FUNGOS I

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo de organismos eucariotes, heterotróficos, aclorofilados, vivendo como saprófitas, como parasitas ou em associação com outros organismos (simbiontes). São caracterizados por uma distinta estrutura filamentosa, multinucleada, conhecida como micélio (podendo apresentar-se com aspectos de algodão).

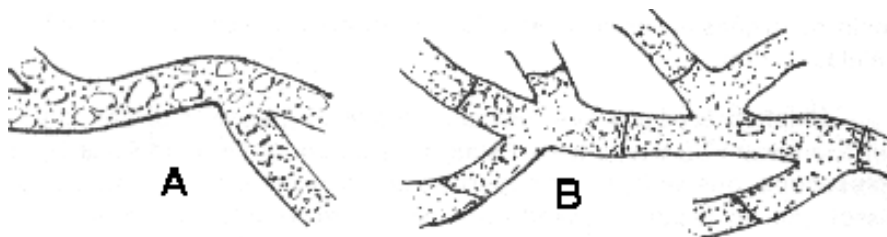
O **micélio** é formado por um conjunto de filamentos microscópicos ramificados com parede celular bem definida que se irradia sobre e/ou dentro do substrato utilizado como alimento. Cada um desses filamentos recebe o nome de **hifa**. A hifa é constituída por uma parede tubular delgada e transparente composta principalmente por polissacarídeos, pequena quantidade de lipídios e íons orgânicos contendo no seu interior o citoplasma que apresenta solutos dissolvidos, no qual estão imersas organelas membranosas, como

mitocôndrias, complexo de Golgi e microcorpos, bem como estruturas não membranosas, como ribossomos, microtubos e microfilamentos.



Representação esquemática de hifas fúngicas e seus principais componentes. A = estrutura de uma hifa jovem; B = estrutura de uma hifa madura; m = membrana; v = vacúolo; gl = globos lipídicos; n = núcleo; c = citoplasma; mi = mitocôndria; s = septo; t = trabécula [adaptado de Silveira (1968) (ZAMBOLIM, SIQUEIRA, 1985; AMORIM, REZENDE, BERGAMIN FILHO, 2011)].

A hifa pode ser contínua ou apresentar paredes transversais que a dividem, denominadas septos, sendo, portanto, chamada de hifa septada (B). Esta possui um poro em cada septo para passagem do líquido protoplasmático. A hifa sem septo é chamada asseptada (A) ou cenocítica, porque os núcleos distribuem-se num protoplasma comum.



Fonte: Amorim, Rezende, Bergamin Filho, 2011.

13.1. Prática

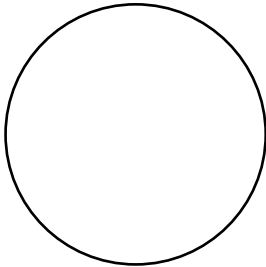
- 1) Observar e desenhar micélio em cultura de fungos disponíveis.
- 2) Fazer preparações microscópicas (preparação a fresco com coloração) das culturas recebidas, observar vários campos e desenhar.

Materiais:

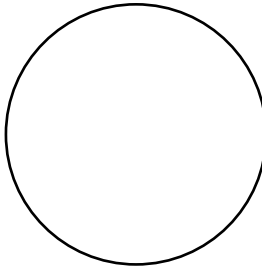
- Cultura esporulada de vários fungos;
- Líquido de montagem (Azul de algodão);
- Lâmina e lamínula;
- Estilete.

Resultados:

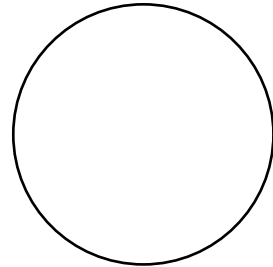
Desenhar os campos observados. Anotar o aumento



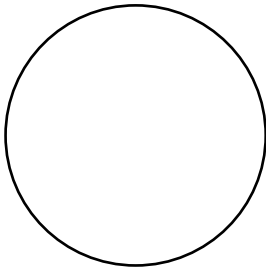
Aumento:



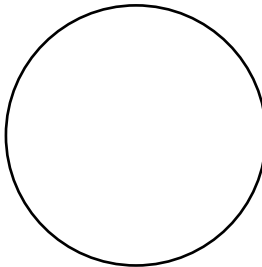
Aumento:



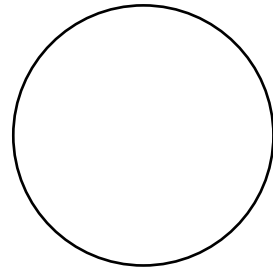
Aumento:



Aumento:



Aumento:



Aumento:

Questões:

- a) A que Divisão pertence os fungos observados?
- b) Caracterizar, resumidamente, as classes dos fungos observados.
- c) Esquematizar uma hifa apocítica e outra cenocítica. Observa-se qual dos dois tipos de hifas ao microscópio?
- d) Discutir a importância dos fungos para a Agricultura.

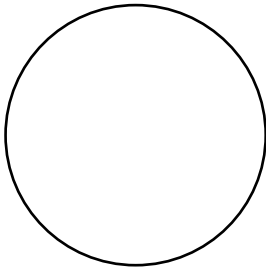
OBSERVAÇÃO DE FUNGOS II

- 1) Observar vários campos das lâminas recebidas, distinguindo:
 - b) Hifa vegetativa;
 - c) Esporangióforo;
 - d) Esporângio e esporangiósporo;
 - e) Rizoides e estolon;
 - f) Asco e ascósporos;
 - g) Urediniósporos;
 - h) Conídios.
- 2) Estruturas:
 - a) Escleródios
 - b) Apotécios

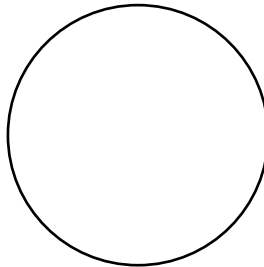
Material: Lâminas preparadas;

Resultados:

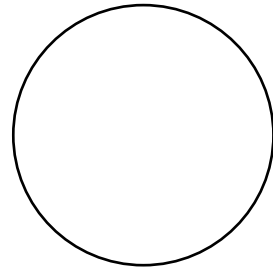
Desenhar todos os campos observados. Anotar o aumento utilizado.



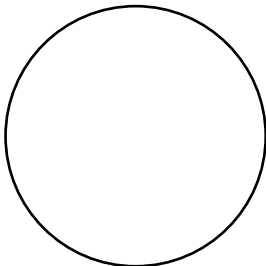
Aumento:



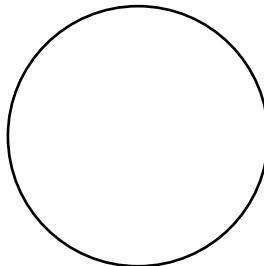
Aumento:



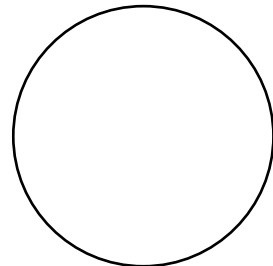
Aumento:



Aumento:



Aumento:



Aumento:

Questões:

- a) Quantos ascósporos existem dentro de cada asco?
- b) Que dificuldade encontrou no preparo das lâminas?
- c) Descrever as estruturas observadas.

14. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA

A água para consumo deve ser isenta de microrganismos causadores de doenças e de substâncias químicas prejudiciais à saúde. Microrganismos patogênicos não crescem em águas relativamente puras, mas podem sobreviver por vários dias.

Para o controle bacteriológico de água seria necessário detectar a presença de microrganismos patogênicos. A princípio, pareceria mais natural que se procurasse isolar, diretamente da água, os agentes responsáveis pelas doenças de origem hídrica. Infelizmente, os procedimentos analíticos para bactérias patogênicos não são satisfatórios, pois uma vez que os patógenos são muito mais **fastidiosos** que bactérias comuns, eles não são detectados por técnicas microbiológicas normais. Ao invés de testar a qualidade da água pela presença de patógenos específicos, usa-se comumente verificar a presença de um grupo de bactérias não patogênicas, cuja origem é de material fecal e que serve como indicador da presença de contaminação fecal: as **bactérias coliformes**.

As bactérias coliformes são membros da família Enterobacteriaceae e incluem os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. São bacilos aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram negativos, não esporulados e fermentam a lactose com produção de gás. São habitantes naturais do trato intestinal do homem e de animais vertebrados superiores. Uma vez que as doenças de maiores importâncias epidemiológicas são transmitidas pela ingestão de água contaminada por material fecal, a detecção das bactérias do grupo coliforme constitui um método relativamente seguro, fácil e rápido de determinar a poluição fecal, pois onde há bactérias intestinais, há contaminação com material fecal, o que represente um perigo potencial.

A pesquisa do grupo coliforme se faz por meio dos testes presuntivo, confirmativo e completo. Nas análises de rotina, normalmente se faz apenas o teste presuntivo.

Cuidados especiais devem ser tomados em relação à coleta de amostras, a fim de se evitar alteração da flora microbiana presente na água.

Exercícios Práticos

Materiais:

- Frascos esterilizados para coleta de amostras;
- Pipeta de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL esterilizadas;
- Tubos com caldo lactose para fermentação;
- Agar nutritivo para placa;
- Tubos de Durham.

Procedimento:

1. Colher as amostras de água, observando os cuidados requeridos para cada caso em particular;
2. Agitar a amostra por 25 vezes;
3. Transferir com assepsia: 10 mL; 1 mL e 0,1 mL da amostra para os tubos com caldo lactose, formando 3 séries de 5 tubos (ver esquema).
4. Incubar os tubos de 37 °C por 24 e 48 horas.
5. Transferir 1 mL e 0,1 para as placas de Petri e adicionar ágar nutriente fundido e resfriado a 45°C. Incubar uma placa com 1 mL e uma com 0,1 mL a 22 °C e as duas restantes a 37 °C por 24 a 48 horas.

Resultados:

Examinar os tubos com caldo lactose quanto à produção de gás. Anotar o número de tubos positivos para cada diluição e determinar o número mais provável pela tabela.

Classificar a água.

Questões:

- 1) Enumerar algumas doenças que podem ser transmitidas pela água, bem como seu agente etiológico.
- 2) Por que a análise bacteriológica não pesquisa diretamente os germes causadores da doença?

Análise de água - Ficha

Procedência: _____ Local da coleta: () Caixa d'água
 Remetente: _____ () Cisterna
 Data da coleta: _____ () Córrego - rio
 Data do exame: _____ () Lagoa
 Natureza da amostra: () In natura () Torneira
 () Tratada
 () Filtrada

TESTE PRESUNTIVO

	10	10	10	10	10	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Caldo lactosado 24 h.															
Caldo lactosado 48 h.															

(+) positivo: presença de bolhas de ar
 (-) negativo: ausência de bolhas de ar

TESTE CONFIRMATIVO

	10	10	10	10	10	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Bile verde brilhante															

NMP (Número Mais Provável de *E. coli*) por 100 mL:

Conclusão do Exame Bacteriológico:

NMP= 2- Água boa

Responsável pelo Exame

NMP= de 2 a 11- Água suspeita

NMP= 11- Água ruim

Fonte: Cassini (1983)

Tabela do NMP de coliformes por 100 mL da amostra e os limites de confiança de 95%, quando são usados 5 tubos para cada volume de 10; 1 e 0,1 mL.

Nº de tubos positivos			N.M.P 100 mL ⁻¹	Limite de confiança 95%		Nº de tubos Positivos			N.M.P 100 mL ⁻¹	Limite de confiança 95%	
10mL	1mL	0,1mL		Inf.	Sup.	10mL	1mL	0,1mL		Inf.	Sup.
0	0	1	2	0,5	7	4	2	1	26	9	78
0	1	0	2	0,5	7	4	3	0	27	9	80
0	2	0	4	0,5	11	4	3	1	33	11	93
1	0	0	2	0,5	7	4	4	0	34	12	93
1	0	1	4	0,5	11	5	0	0	23	7	70
1	1	0	4	0,5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	1	6	0,5	15	5	0	2	43	15	114
1	2	0	6	0,5	15	5	1	0	33	11	93
2	0	0	5	0,5	13	5	1	1	46	16	120
2	0	1	7	1	17	5	1	2	63	21	150
2	1	0	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	1	9	2	21	5	2	1	70	23	170
2	2	2	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
3	0	0	8	1	19	5	3	1	109	33	250
3	0	1	11	2	25	5	0	0	141	33	340
3	1	0	11	2	25	3	2	2	175	44	500
3	1	1	14	4	34	5	3	3	130	35	300
3	2	0	14	4	34	5	4	0	172	43	490
3	2	1	17	5	46	5	4	1	221	57	700
3	3	0	17	5	46	5	4	2	278	90	850
4	0	0	13	3	31	5	4	3	345	120	1000
4	0	1	17	5	46	5	4	4	240	68	750
4	1	0	17	5	46	5	5	0	348	120	1000
4	1	1	21	7	63	5	5	1	542	180	1400
4	1	2	26	9	78	5	5	2	918	300	3200
4	2	0	22	7	67	5	5	3	1609	640	5800

Fonte: Cassini (1983)

III. APÊNDICE: Corantes, Reagentes e Meios de Cultura.

1. Azul de metileno (Loeffler)

Solução A:

Azul de metileno	0,3 g
Álcool etílico	30,0 mL

Solução B:

Hidróxido de potássio	0,01 g
Água destilada	1000 mL

Misturar Solução A e B

2. Cristal Violeta

Solução A:

Cristal de Violeta (85%)	2,0 g
Álcool etílico	20,0 mL

Solução B:

Oxalato de Amônia	0,8 g
H ₂ O destilada	80,0 mL

Misturar Solução A e B

3. Fucsina de Ziehl

Solução A:

Fucsina básica (90%)	0,3 g
Álcool etílico (95%)	10,0 mL

Solução B:

Fenol	5,0 g
Água destilada	95,0 mL

Misturar Solução A e B

4. Lugol

Iodo	1,0 g
Iodeto de potássio	2,0 g
Água destilada	300 mL

Dissolver o iodeto de potássio em água e acrescentar o iodo.

5. Eritrosina Fenicada

Eritrosina	1,0 g
Fenol (5% solução aquosa)	100 mL

Dissolver a Eritrosina no Fenol

6. Barrit - reativo (teste de VP)

Solução A:

Alfa-naftol	6,0 g
Álcool etílico	100,0 mL

Solução B

Hidróxido de potássio	16 g
Água destilada	1000 mL

Conservar as soluções em frascos separados

7. Vermelho de Metila

Vermelho de metila	0,1 g
Álcool etílico	300,0 mL
Hidróxido de sódio (0,1N)	3,7 mL
Água destilada	500 mL

8. Caldo Glucose

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Glucose	10,0 g
Água destilada	1000 mL

9. Caldo Sacarose

Extrato de Carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Sacarose	10,0 g
Água destilada	1000 mL

10. Ágar amido

Amido solúvel	200,0 g
Ágar nutritivo	1000 mL

11. Ágar extrato de solo

Glucose	15,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
*Extrato de solo	100,0 mL
Água da torneira	900 mL
Ágar	15,0 g

*Extrato de solo esterilizado para uso no meio: juntar 1L de água de torneira a 1 Kg de solo rico. Agitar e autoclavar por 30 minutos. Acrescentar um pouco de CaCO₃ e filtrar a suspensão. Essa suspensão deve ser filtrada novamente até tornar mais claro. Acondicionar em frascos de 100 mL e autoclavar por 15 minutos.

12. Meio "79" (*Rhizobium*)

Sacarose (açúcar cristal)	5,0 g
Gluconato de Na (aginomoto)	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Água destilada	1000 mL
Ágar	15,0 g

Vermelho Congo: adicionar 30,0 mL.L⁻¹ de uma solução alcoólica a 1/200.

13. MB - (meio básico)

Amido solúvel	10,0 g
Caseína ácida hidrolizada	10,0 g
Glucose	1,0 g
Na ₂ HPO	3,0 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL

14. MB - 2 (Catalase)

Sacarose	10,0 g
Caseína Ácida hidrolisada	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
K ₂ HPO	2,0 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,3 g
H ₂ O destilada	1000 mL

15. Azul de metileno (MB - 4):

Distribuir 1 mL de solução de azul de metileno 1:20000 em cada tubo contendo MB - 2.

16. Gelatina

Caseína ácida hidrolizada	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
Gelatina	150,0 g
Água destilada	1000 mL

17. V.M. e V.P.

Glucose	5,0 g
Peptona	5,0 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
Água destilada	1000 mL

18. BDA (Batata-Dextrose-Ágar)

Batata	200 g
Dextrose	15 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL

19. Caldo nutritivo

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000 mL

20. Ágar Nutriente

Caldo nutritivo	1000 mL
Ágar	15,0 g

21. Solução Sulfo-Crômica

Ácido Sulfúrico Concentrado	460 mL
Dicromato de potássio	60,0 g
Água destilada	1000 mL

22. Meio para Actinobactérias

K ₂ HPO	1,0 g
Asparagina de sódio	10,0 g
Glicerol	10,0 g
Solução de oligoelementos	1,0 mL
Gelosa ou Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

PH final 7,0

Para isolamento de *Streptomyces*, pode-se utilizar 1,0 mL de uma solução padrão de 100 mg.mL⁻¹ de estreptomicina para inibição de bactérias.

23. Caldo lactose

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactose	10,0 g
Água destilada	1000 mL

pH 6,8 - 7,0

24. Eosina Azul de Metileno (Agar)

Peptona	10,0 g
Lactose	10,0 g
Fosfato dipot. (K_2HPO_4)	2,0 g
Ágar	15,0 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Água destilada	1000 mL

Esterilizar 115 °C por 15 a 20 minutos.

25. Solução Sacarose

- Para preparação de esporos de fungos endomicorrízicos e nematoides.

Sacarose	454 g
Água destilada	1000 mL

26. Caldo Lactosado verde Bile Brilhante 2%

Peptona	10,0 g
Lactose	10,0 g
Bile de boi desidratado	20,0 g
Verde Brilhante	0,0133 g
H ₂ O destilada	1000 mL

27. Caldo Indol

Triptona	5,0 g
NaCl	2,5 g
Água destilada	1000 mL

28. Indicador de Andrade

Fucsina ácida	1,0 g
H ₂ O destilada	200 mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2016. v. 1. 516p

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A, MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C, MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos de fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 53-90

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) **Manual de Fitopatologia. Volume 1 - Princípios e Conceitos**. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011. 704 p.

CARVALHO, E. M. S. Caracterização e Classificação de Ectomicorrizas de *Pinus* spp encontradas em Duas Florestas de Minas Gerais. Viçosa, Imprensa Universitária, U. F. V. 1984 (Tese de Mestrado).

CASSINI, S. T. A. **Exercícios Práticos de Microbiologia do Solo**. Viçosa, Imprensa Universitária, U. F. V. 1983.

COUTO, H. A. R. **Limpeza nos Laboratórios: procedimentos e cuidados especiais**, EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus, 2011, 17p.

DOBEREINER, J. Bases Científicas para uma Agricultura Biológica. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 8. 1981.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos fito patogênicos**. São Paulo Biológico 63:59-68, 2001.

HUNGRIA, M., ARAÚJO, R. S., ARAÚJO, F. F.; JAMES, E. Princípios básicos em um laboratório de Microbiologia. In: Hungria, M.; Araújo, R. (eds) **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542p.

LOURES, E. G.; GUIMARÃES, W. V. **Microbiologia. Técnicas de laboratório. Principais provas Empregadas para Identificação de Bactérias**. Viçosa, Imprensa Universitária, U. F. V. 1981.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª Ed., Londres: Pearson Education do Brasil Ltda., 2004. 624p.

NIKON INSTRUMENTS, INC. **Instruções de uso do Microscópio E200**. Melville (EUA), 2012, 88 p.

PELCZAR, JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia. Conceito e Aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997. 896 p.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**, Sixth edition, McGraw Hill International edition, New York. 2005. 686p.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 112p.

SANTOS, Faria. **Micorrizas**. 2016. 103 slides. Disponível em: <https://www.slideshare.net/Proplant/micorrizas-68120870>

SCHWAN, K. R. F. Caracterização, Incidência e ecologia de Micorrizas em Viveiros e florestas de *Eucalyptus* spp, na Região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, Imprensa Universitária, U.F.V. 1984 (Tese de Mestrado).

SILVA & BATISTA, C. F.; DIAS, E. S.; CARDOSO, P. G.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. **Práticas de Microbiologia Geral** (GBI 111 e 132). Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2016. 87 p. (apostilado).

SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**. v. 10. n. 3, p. 612-618, 2006 <https://doi.org/10.1590/S1415-43662006000300011>

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.920 p.

ZAMBOLIM, L., SIQUEIRA, J. O. **Importância e Potencial das Associações Micorrízicas para a Agricultura**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1985, 36 p. Série Documentos, 26.

SOBRE OS AUTORES

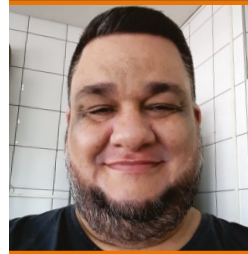
Prof^ª. Dr^ª. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada é Agrônoma (UFES), mestre em Microbiologia Agrícola (UFV) e doutora em Agronomia (Fitopatologia - ESALQ/USP). É Professora Associada C na Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR) onde ministra as disciplinas de Microbiologia Agrícola, Microbiologia do Solo, Manejo Agroecológico de doenças de plantas e Fisiologia do Parasitismo. É orientadora de Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado e Supervisora de Pós-doutorado. Atualmente é coordenadora adjunta no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia - Mestrado profissional (UEM-PR).

Prof. Dr. Julio Cesar Tocacelli Colella fez sua graduação em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (2004), mestrado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (2008) e doutorado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá sempre com o orientador Prof. Dr. João Batista Vida. Na área de Agronomia tem experiência nos seguintes temas: Fitotecnia, Horticultura, Agroinformática, Fitopatologia e Entomologia Agrícola. Na data de edição deste livro trabalha como Docente e Coordenador no Centro Universitário UniFatecie.

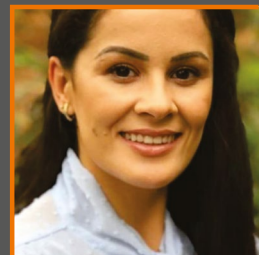
Prof^ª. Me. Bruna Broti Rissato é Agrônoma e mestre em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE-PR). Atualmente, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Kátia R. F. Schwan-Estrada, cursa Doutorado em Agronomia em Proteção de Plantas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR) e pesquisa principalmente sobre controle alternativo de doenças de plantas, indução de resistência, atividade antimicrobiana e homeopatia na agricultura.



Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada é Agrônoma (UFES), MSc em Microbiologia Agrícola (UFV) e Dra. em Agronomia (Fitopatologia-EŚALQ/USP). Coordenadora adjunta no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia - Mestrado profissional (UEM-PR).



Prof. Dr. Julio Cesar Tocacelli Colella fez sua graduação em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (2004), Mestrado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (2008) e Doutorado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá. Na data de edição deste livro trabalha como Docente e Coordenador no Centro Universitário UniFatecie.



Prof. MSc. Bruna Broti Rissato é Agrônoma e mestre em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE-PR). Atualmente, sob orientação da Prof^a. Dr.^a Kátia R. F. Schwan-Estrada, cursa Doutorado em Agronomia em Proteção de Plantas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR).



Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-65-87911-10-6



9 786587 191110 6

+55 (44) 3045 9898
Rodovia BR 376, Km 102, nº 1.000
CEP 87.720-140 - Paranavaí - PR
www.unifatecie.edu.br/editora
edufatecie@fatecie.edu.br

Em um longínquo ano de 2003, o aluno de Agronomia Julio Cesar, tinha contato pela primeira vez com Microbiologia Agrícola, um mundo no qual a Professora Kátia, mostrava com toda a desenvoltura todo o mundo dos microrganismos, o qual o fascinou até os dias de hoje, mas o que fez para este aluno ficar mais fascinado ainda, foram as aulas práticas! Não eram aulas práticas simples do tipo "faça você mesmo", mas práticas com uma apostila, já digital na época, que detalhava passo a passo as metodologias que deveriam ser feitas, e quando este aluno viu esta apostila, sempre teve o sonho de transformar aquela simples apostila, em um livro que serviria de base para as aulas práticas de Microbiologia Agrícola. Anos se passaram, a apostila foi tomando um formato maior e melhor e o antigo aluno, hoje professor de Microbiologia Agrícola, notou que estava mais do que na hora de realizar o sonho de sua Professora e auxiliar as disciplinas de Microbiologia Agrícola dos cursos de Agrárias com este livro.