



EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA

MICROBIOLOGIA

EDITORA
UFMG

MICROBIOLOGIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitoria de Graduação

Pró-Reitor: Mauro Braga

Pró-Reitora Adjunta: Carmela Maria Pólito Braga

Coordenadora do Centro de Apoio à Educação a Distância:

Maria do Carmo Vila

EDITORA UFMG

Diretor: Wander Melo Miranda

Vice-Diretora: Silvana Cóser

Conselho Editorial

Wander Melo Miranda (presidente)

Carlos Antônio Leite Brandão

José Francisco Soares

Juarez Rocha Guimarães

Maria das Graças Santa Bárbara

Maria Helena Damasceno e Silva Megale

Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Silvana Cóser

ARY CORRÊA JUNIOR

MICROBIOLOGIA

Belo Horizonte
Editora UFMG
2006

© 2006, OS AUTORES

© 2006, Editora UFMG

Este livro ou parte dele não pode ser reproduzido por qualquer meio sem autorização escrita do Editor.

C824m	Corrêa Junior, Ary Microbiologia / Ary Corrêa Junior . – Belo Horizonte : Editora UFMG, 2006. (Educação a Distância) 76 p. : il. – (Educação a Distância)
	Inclui referências ISBN: 85-7041-530-3 ISBN: 85-7041-542-7 (da série)
	1. Microbiologia. I. Título. II. Série.
	CDD: 576 CDU: 579

Ficha catalográfica elaborada pela CCQC - Central de Controle de Qualidade da Catalogação da Biblioteca Universitária da UFMG

Este livro recebeu o apoio financeiro da Secretaria de Educação a Distância do MEC.

COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO DE TEXTOS DE BIOLOGIA: Gleydes Gambogi Parreira

EDITORAÇÃO DE TEXTOS: Ana Maria de Moraes

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO: Maria do Carmo Leite Ribeiro

REVISÃO DE PROVAS: Eduardo Martins / Sayonara A. M. Gontijo

PRODUÇÃO GRÁFICA: Warren M. Santos

PROJETO GRÁFICO, ILUSTRAÇÃO e CAPA: Eduardo Ferreira

FORMATAÇÃO: Edwaldo Ferreira

EDITORA UFMG

Av. Antônio Carlos, 6.627 - Ala direita da Biblioteca Central - Térreo

Campus Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG

Tel.: (31) 3499-4650 - Fax: (31) 3499-4768

www.editora.ufmg.br - editora@ufmg.br

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Antônio Carlos, 6.627 - Reitoria - 6º andar

Campus Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG

Tel.: (31) 3499-4654 - Fax: (31) 3499-4060

www.ufmg.br - info@prograd.ufmg.br - educacaoadistancia@ufmg.br

O Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UFMG, modalidade a distância, foi concebido tendo em vista dois princípios fundamentais. O primeiro deles se refere à democratização do acesso à educação superior; o segundo consiste na formação de professores de alto nível, comprometidos com a qualidade da educação no país.

A coletânea da qual este volume faz parte visa dar suporte aos estudantes do Curso. Cada volume está relacionado com um tema, eleito como estruturante na matriz curricular. Ele apresenta os conhecimentos mínimos que são considerados essenciais no estudo do tema. Isto não significa que o estudante deva se limitar somente ao estudo do volume. Ao contrário, ele é o ponto de partida na busca de um conhecimento mais amplo e aprofundado sobre o assunto. Nessa direção, cada volume apresenta uma bibliografia, com indicação de obras impressas e obras virtuais, que deverá ser consultada à medida que se fizer necessário.

Cada volume da coletânea está dividido em aula, que consistem em unidades de estudo do tema tratado. Os objetivos, apresentados em cada início de aula, indicam as competências e habilidades que o estudante deve adquirir ao término de seu estudo. As aulas podem se constituir em apresentação, reflexões e indagações teóricas, em experimentos ou em orientações para atividades a serem realizadas pelos estudantes.

Para cada aula ou conjunto de aulas, foi elaborada uma auto-avaliação, com o objetivo de levar o estudante a avaliar o seu progresso e a desenvolver estratégias de metacognição ao se conscientizar dos diversos aspectos envolvidos em seus processos cognitivos. A auto-avaliação auxiliará o estudante a tornar-se mais autônomo, responsável, crítico, capaz de desenvolver sua independência intelectual. Caso ela mostre que as competências e habilidades indicadas nos objetivos não foram alcançadas, ele deverá estudar com mais afinco e atenção o tema proposto, reorientar seus estudos ou buscar ajuda dos tutores, professores especialistas e colegas.

Agradecemos a todas as instituições que colaboraram na produção desta coletânea. Em particular, agradecemos às pessoas (autores, coordenador da produção gráfica, coordenadores de redação, desenhistas, diagramadores, revisores) que dedicaram seu tempo e esforço na preparação desta obra que, temos certeza, em muito contribuirá para a educação brasileira.

SUMÁRIO

	Introdução.	09
	Arquitetura do fascículo	09
Aula 1	Isolamento de microorganismos	11
	Introdução.	11
	Material e métodos	12
	Observação dos resultados	13
	Caracterização de bactérias do solo	13
	Caracterizando fungos e bactérias.	14
Aula 2	Vírus.	33
	Introdução.	33
	Bacteriófagos.	33
	Morfologia e estrutura viral	34
	Ciclo de vida viral.	35
Aula 3	Microorganismos e ciclos biogeoquímicos	41
	Ciclo do nitrogênio	41
Aula 4	Microbiologia e o homem.	47
	Introdução.	47
	HIV.	47
	Probióticos	49
ANEXOS		
Anexo I	Normas para trabalhos práticos em microbiologia.	53
Anexo II	Manual para confecção de relatório	55
Anexo III	Técnicas de assepsia	65
Anexo IV	Meios de cultura	67
Anexo V	Testes bioquímicos	69
Anexo VI	Teste de Gram	73

INTRODUÇÃO

Ary Corrêa Júnior

A microbiologia se preocupa em estudar fungos, bactérias, vírus e organismos assemelhados. A disciplina se interessa em compreender a organização celular, bioquímica e fisiológica destes organismos, bem como a sua interação com outras espécies e o ambiente. Por abranger organismos de grupos filogeneticamente distantes, o estudo da microbiologia se utiliza de uma grande variedade de estratégias para a detecção, isolamento, identificação e experimentação. Este fascículo tentará introduzir o estudante às técnicas rotineiramente utilizadas pelos microbiologistas e através de sua utilização discutir os grandes grupos de microrganismos quanto à sua estrutura e suas relações com o ambiente, outros organismos e o homem.

O primeiro capítulo discutirá as técnicas de isolamento e identificação de fungos e bactérias. No segundo, a estrutura molecular dos vírus será abordada. O terceiro capítulo versará sobre o papel de microrganismos nos ciclos biogeoquímicos, e o quarto na importância econômica de microrganismos nos sistemas agrícola-industriais e com o homem.

ARQUITETURA DO FASCÍCULO

Todos os capítulos deste fascículo iniciam com um procedimento experimental a ser realizado pelo aluno, em seu domicílio ou no núcleo de instrução. Este experimento remeterá a uma série de questões e conceitos que deverão ser respondidos e compreendidos pelo aluno. Informações complementares necessárias para a compreensão do experimento estão descritas no Anexo 1 do fascículo e estão anotados no texto.

Após a descrição do experimento o aluno será convidado a ler o texto subsequente onde os fundamentos teóricos da disciplina serão abordados. Quando necessário este texto remeterá a outras fontes (páginas da Internet, livros-textos etc.) para um maior detalhamento dos conceitos. Estas fontes adicionais estarão marcadas no texto.

Ao fim da leitura o aluno será estimulado a redigir um relatório da atividade (segundo o modelo do Anexo 2) e responder uma série de questões de reforço.

Os experimentos foram idealizados tendo em vista a sua facilidade de execução, baixo custo, ausência de risco à saúde e, claro, tendo em vista o fato de serem ilustrativos dos principais conceitos em microbiologia.

Isolamento de Microorganismos

INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em quase todos os ambientes da terra. Entretanto, raramente são detectados por observadores não qualificados. A grande maioria dos microrganismos passa despercebida, pois eles são unicelulares e diminutos (bactérias e leveduras), ou quando são multicelulares (fungos filamentosos) apenas são visíveis a olho nu durante uma fase do seu ciclo de vida. Entre os microrganismos estão os indivíduos de maior massa e tamanho conhecidos. Por exemplo, um indivíduo do fungo filamentoso do solo *Armillaria ostoyae* mediu 600 hectares de tamanho, pesou aproximadamente 400 toneladas e teve sua idade estimada em 2.400 anos. Apesar deste tamanho ele só é visualizado e caracterizado a olho nu durante a fase de frutificação na qual os cogumelos do fungo são produzidos. Uma pesquisa na Internet com o termo *humongous fungus* seguramente vai te levar a vários exemplos de fungos de tamanho avantajado. A diversidade microbiana também é enorme. Acredita-se que existam entre 10 milhões e 1 bilhão de espécies diferentes de bactérias formando um conjunto de 10^{30} células. Apenas para comparação, acredita-se que existam 10^{30} gotas d'água nos oceanos. Quanto aos fungos, estima-se a existência de 1,5 milhões de espécies diferentes. Novamente, toda esta biodiversidade e volume não é corriqueiramente observada por nós, para tanto, são necessárias técnicas de cultivo que permitam o crescimento destes microrganismos para que um conjunto de células possa ser observado. Propomos um experimento simples, que servirá de demonstração das principais técnicas de isolamento e identificação de microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de fungos saprófitas pectinolíticos

Selecione 10 laranjas maduras, sem manchas ou injúrias. As variedades Pêra-Rio e Valência se prestam bem ao experimento. Faça uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (uma solução comercial de hipoclorito normalmente contém de 2 a 2,5% de hipoclorito ativo, portanto dilua uma parte da solução comercial em 4 partes de água. **Cuidado:** hipoclorito é altamente corrosivo e reativo. Use roupa protetora, não manipule o produto em recintos pequenos e sem ventilação e mergulhe as laranjas nesta solução por 15 minutos. Após este período, enxágüe as laranjas em água esterilizada (Autoclavada – Anexo 4) e as deixe secar. Com o auxílio de uma lâmina estéril, retire longitudinalmente uma porção da casca da laranja deixando o albedo (parte branca da casca) exposta (Figura 1). Deixe as laranjas no ambiente por 2 a 3 horas. Após este período transfira as laranjas para as câmaras de incubação e as incube por 10 a 15 dias observando-as diariamente. As câmaras de incubação podem ser feitas facilmente com caixas plásticas para transporte de bolos e copinhos de café de PVC (Figura 2). Observe a área injuriada e qualquer modificação na coloração e aspecto do albedo. É comum o aparecimento de um bolor, esverdeado, azulado ou marrom na área injuriada. Com o auxílio de uma agulha estéril, transfira uma porção deste material para uma placa de ágar batata-dextrose-ágar (vide Anexo 3).

Isolamento de bactérias do solo

Ressuspender 1 g de solo (primeiros 5 cm de profundidade) em 9 ml de solução salina estéril e agitar vigorosamente. Recolher 1 ml desta solução e diluir em 9 ml de solução salina estéril. A partir desta solução retirar 1 ml e diluir em 9 ml de solução salina mais 2 vezes. Retirar 1 ml desta diluição final (10^{-4}) e transferir assepticamente (vide Anexo 3) para uma placa de Petri contendo o meio sólido TSA (*Tryptic soy agar* - Anexo 4) e espalhar com o auxílio de uma alça de Drygalsky (Anexo 3). Incubar a temperatura ambiente por 48 h. Após este período observe o aspecto das colônias crescidas no meio. Escolha uma destas colônias e transfira assepticamente para os tubos de ágar TSA e após 24 h de crescimento transfira amostras da bactéria para os tubos da série bioquímica (Anexo 5). Após 24 h observe as modificações nos tubos da série e as compare com a tabela de identificação de bactérias (Anexo 5). Faça o teste de Gram (Anexo 6) para a bactéria que você isolou. Compare com o observado por seus colegas.

Isolamento de fungos do ar

Mantenha aberta por 5 ou 15 min. as placas de meio de cultura Batata – Dextrose – Ágar (BDA). Incube as placas por 7 dias à temperatura ambiente e observe as colônias formadas. Após este período escolha uma colônia filamentosa e transfira assepticamente para um tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado. Transfira propágulos do fungo de interesse para a borda de um bloco de ágar BDA em uma preparação de microcultivo em lâmina (Anexo 7). Incube à temperatura ambiente por 7 dias ou até a observação de esporulação.

OBSERVAÇÃO DOS RESULTADOS

Discuta com os seus colegas as seguintes questões:

Observe qual o aspecto das colônias nas placas de ágar BDA e TSA.

De uma maneira geral, como você descreveria a morfologia destas colônias?

A partir da forma das colônias você conseguiria imaginar como estes organismos estão se desenvolvendo?

De onde vieram estas colônias?

Elas são iguais? Descreva a morfologia das colônias que você observa. Quantas colônias de cada morfologia você tem na placa?

As colônias de seus colegas de sala são iguais às suas? Se não, como explicar esta diferença?

Qual a diferença entre o meio BDA e TSA que explica as diferentes colônias observadas?

Existem mais colônias diferentes nas laranjas do que nas placas? Por quê?

Corte a laranja e observe o seu interior. Onde os fungos estão se desenvolvendo?

O que é um meio de cultura?

Todas as colônias que você considerou como iguais são do mesmo organismo?

Você acredita que a morfologia da colônia é suficiente para caracterizar as diferentes espécies de fungos e bactérias?

Após esta discussão vamos à segunda parte da análise de dados.

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO

Os seus resultados para a série bioquímica são iguais aos dos seus colegas? E a morfologia das colônias originais?

Serão estes testes suficientes para caracterizar diferentes espécies de bactérias? O que é uma espécie de bactéria?

A diferença em um único teste é suficiente para separar espécies?

O teste de Gram é importante para a separação das bactérias?

O que o teste da catalase indica? E o de oxidação?

Se por acaso a bactéria que você isolou não corresponde a nenhum perfil das tabelas de identificação, ela é uma nova espécie?

A partir da discussão do grupo escreva um relatório destas atividades.

CARACTERIZANDO FUNGOS E BACTÉRIAS

A partir dos experimentos anteriores você percebeu que após a devida incubação desenvolveram-se nas placas aglomerados celulares. Alguns tinham a forma aveludada ou cotonosa (Figura 3), que a observação cuidadosa revelou ser o resultado de inúmeros filamentos aglomerados. Outros possuíam uma forma brilhante e cremosa (Figura 3). Cada um destes “aglomerados”, na verdade, é o resultado da multiplicação de uma única célula inicial e portanto possuem o mesmo arcabouço genético, ou seja, são clones. Ao grupo de células resultante de um crescimento clonal chamamos de colônia. Obviamente, devido ao processo continuado de divisão celular, algumas raras células desenvolverão defeitos de divisão e poderão divergir geneticamente da célula parental. A este variante chamamos mutante. Note que as colônias apresentam, além de diferenças no tipo de crescimento (filamentoso ou cremoso), diferenças em cor, forma e tamanho. Estas diferenças caracterizam o que chamamos morfotipo, ou seja, colônias com características morfológicas macroscópicas, que permitem a sua separação. Às estruturas que deram início ao crescimento da colônia denominamos propágulos, e normalmente também são as estruturas pelas quais os microrganismos se dispersam.

As colônias filamentosas que aparecerem em suas placas são o resultado do desenvolvimento de um fungo filamentoso. As colônias cremosas são bactérias ou leveduras. Vamos discutir com mais detalhe estes dois grupos.

Fungos

Definição

Fungos são organismos eucariotos, uni ou pluricelulares, heterotróficos, não clorofilados, com parede celular contendo quitina. Multiplicam-se por divisão binária, brotamento ou pela produção de filamentos. Aos fungos que se dividem por divisão binária ou brotamento denominamos

fungos leveduriformes ou leveduras, enquanto aos que formam filamentos chamamos fungos filamentosos ou bolores.

Estruturas fúngicas

Os propágulos fúngicos podem ser esporos, hifas, micélio, células livres e estruturas especiais como esclerócitos, corpos de frutificação etc.

Esporos são estruturas originadas de processos mitóticos ou meióticos e normalmente funcionam como estruturas de dispersão do organismo. Para tanto possuem pouca atividade metabólica, são geralmente desidratados e podem ser carreados pelo vento, água, animais e sementes. Dependendo da maneira pela qual são dispersos podem possuir estruturas diversas, assim um esporo disperso pela água pode possuir flagelos (zoósporos, Figura 4) ou ser hidrofóbico para boiar sobre a água. Os esporos dispersos pelo ar (anemófilos) serão pouco densos, com espículas ocas, os que necessitam de animais ou sementes para a dispersão geralmente serão cobertos por mucilagem que auxiliará na fixação ao corpo do vetor (Figura 4).

Caso os esporos tenham ontologia mitótica serão obviamente esporos assexuados. Esporos assexuados de fungos são denominados conídios. Caso os conídios sejam unicelulares serão chamados de microconídios e os multicelulares são denominados macroconídios (Figura 4). Os conídios são formados a partir de estruturas diferenciadas do talo fúngico denominadas conidióforos (Figura 5). Alguns fungos formam os seus conídios diretamente na hifa sem a formação de conidióforos. Estes esporos, dependendo se são formados apical ou intercaladamente, são denominados clamidósporos. A forma dos conídios e conidióforos normalmente é utilizada para a separação entre as diferentes espécies de fungos. Fungos em que se conhece apenas formas mitospóricas são agrupados no grupo dos fungos deuteromicetos ou mitospóricos.

Esporos sexuais, ou seja, aqueles resultantes de meiose, podem ser divididos em quatro grupos (Figura 6):

- Basidiósporos: aqueles em que a meiose ocorre em estruturas globulares (basídia) e os esporos são formados externamente. Fungos que apresentam estes esporos são agrupados no Filo Basidiomycotina.
- Ascósporos: aqueles em que a meiose e a formação de esporos se dá no interior de uma asca. Esporos que formam ascósporos são chamados de Ascomycotina.
- Zigósporos: aqueles formados pela fusão de gametas similares, formação de um esporo diplóide que ao germinar passará por meiose. Este grupo é denominado Zigomicotina.
- Zoósporos: esporos flagelados e móveis, típicos dos Chitridiomycotina.

Em condições adequadas os esporos deixam o seu estado de pouca atividade metabólica e iniciam o seu desenvolvimento vegetativo; a esta mudança de estado fisiológico chamamos germinação (Veja vídeo 1 – Página do curso na Internet). Como resultado da germinação de um fungo filamentosos ocorre a formação de um tubo germinativo, o qual é uma estrutura tubular que cresce apicalmente. Este tipo de crescimento orientado é típico dos fungos filamentosos e é encontrado apenas nestes fungos e em células de pólen durante o processo de fecundação vegetal. Quando o tubo germinativo forma um septo (Figura 7) ou se alonga por mais do que o dobro do diâmetro do esporo forma-se uma estrutura denominada hifa.

Hifas são também estruturas tubulares, mas diferentemente do tubo germinativo já não estão ligadas fisiologicamente ao esporo, apesar de formarem uma estrutura única. Fungos mitospóricos, ascomicetos, basidiomicetos apresentam septos em suas hifas. Septos são divisões na hifa que separam células fúngicas distintas. Os septos podem possuir morfologias distintas, sendo perfurados (poros) e apresentando estruturas anexas. Alguns ascomicetos possuem estruturas globulares ao lado dos poros (Figura 7) denominados corpos de Woronin. Alguns basidiomicetos, por outro lado, possuem ao redor do poro uma estrutura perfurada que envolve o poro septal (Figura 7) formando um complexo de poro ou doliporo. Hifas normalmente se ramificam, apical ou lateralmente. Como resultado destas ramificações as diferentes hifas se enovelam e formam uma malha de hifas. Este emaranhado de hifas é denominado micélio.

No micélio serão diferenciadas as estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas. Normalmente fungos alternam ciclos de reprodução sexuada e assexuada. Esta alternância está na dependência de fatores fisiológicos e ambientais. Por exemplo, observe a Figura 8. Nela está representada o ciclo de vida do fungo *Rhizopus nigricans*. Você encontra com facilidade fungos deste gênero em podridões de frutos e pão. Vamos iniciar o ciclo no item A da figura. Você vê representada a fase assexual do ciclo onde esporangiósporos haplóides do fungo (esporangiósporos é o nome específico de microconídios de zigomicetos) são liberados de esporângios (novamente esporângio são os conidióforos dos zigomicetos) e cairão no substrato, germinarão e formaram hifas asseptadas. Estas hifas formarão mais esporângios repletos de esporangiósporos que formaram mais micélio e assim sucessivamente por várias gerações. Como um esporangiósporo resultará em milhões de esporangiósporos, ocorrerá o aumento de inóculo (propágulo responsável pelo crescimento inicial do fungo) exponencialmente, resultando na rápida colonização do substrato pelo fungo. Esta é a fase epidêmica ou logarítmica da infecção. Quando a disponibilidade do substrato diminui ou ocorrem variações ambientais, o fungo passa

agora ao ciclo sexual, no qual talos fúngicos distintos paream ramos laterais das hifas (Figura 8) e no ponto de contato entre as hifas ocorre a formação de um gametângio pigmentado. A partir deste gametângio se desenvolve o zigoto, onde núcleos de ambos os talos se fundem formando uma célula polinucleada e diplóide. As paredes do zigósporo (o zigoto maduro) são espessas e garantem resistência ao fungo às mudanças ambientais. Neste estágio ele pode se manter viável (em condições de se reproduzir) até que novamente o hospedeiro ou as condições ambientais sejam encontradas. Quando isto acontece o zigósporo germina (Figura 8), produzindo novos esporângios por meiose, que liberará eporangiósporos haplóides que recomeçaram o ciclo.

Outros fungos formam outras estruturas de resistência como os Esclerócitos. Como as condições ambientais mudam periodicamente e cada espécie fúngica depende de condições específicas para o desenvolvimento, muitos fungos desenvolveram estratégias para resistir a estas mudanças. Uma estrutura com esta finalidade é o esclerócito. Ele é formado a partir de hifas do fungo enveladas e algumas vezes com a adição de material do meio, como restos vegetais e solo. Dentro destas estruturas, o micélio fúngico pode se manter viável por meses ou anos. Em alguns fungos as próprias estruturas sexuais são também estruturas de resistência. Assim, cleistotécios (estruturas fechadas que contêm ascas) de alguns ascomicetos podem também resistir por grandes períodos secos ou de temperaturas não adequadas para o crescimento (Figura 9).

As estruturas nas quais acontece a reprodução sexual e conseqüente dispersão dos esporos são denominadas corpo de frutificação. As formas mais comumente encontradas e com certeza já vistas por você são os ascomarpos e basidiocarpos (Figura 10). Os basidiocarpos são popularmente conhecidos como cogumelo ou orelha de pau.

Fisiologia fúngica

Fungos podem ser encontrados nos ambientes aquáticos marinhos, fluviais e lacustres, no solo, associado a plantas e animais, em substratos artificiais como paredes e encanamentos etc. A sua distribuição é cosmopolita e não limitada a nenhuma restrição geográfica. A sua presença no entanto é limitada pela disponibilidade de água e matéria orgânica. Por se tratar de organismo heterotrófico necessita obrigatoriamente de uma fonte orgânica de energia e, como realiza a digestão da matéria orgânica extracelularmente, necessita de água na forma livre para que as enzimas digestivas excitadas possam atuar, liberando compostos assimiláveis aos fungos. Como a parede fúngica é extremamente higroscópica, a umidade do ar tende a condensar

em volta dos propágulos fúngicos e criar um microambiente com disponibilidade de água livre. É por isso que observamos com frequência o aparecimento de fungos em paredes de casas e cavernas úmidas. Estes organismos são extremamente versáteis quanto a fontes de carbono que podem utilizar, por isso encontramos fungos crescendo em paredes, degradando resíduos orgânicos e a própria tinta. Alguns fungos podem inclusive crescer em solventes e combustíveis. Devido à necessidade de água livre para a germinação e crescimento, fungos não se desenvolvem a temperaturas abaixo do ponto de congelamento, mas algumas espécies podem crescer em temperatura próximas a 0 °C. Outros fungos, como por exemplo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (o fungo utilizado na panificação e produção de bebidas alcoólicas), conseguem se desenvolver nas dornas de fermentação que durante a produção podem atingir temperaturas de até 45 °C. Obviamente, estruturas de resistência podem se manter viáveis em temperaturas ainda mais altas. Quanto ao pH de crescimento, fungos preferencialmente se desenvolvem em pH ácido, mas espécies basofílicas são também encontradas.

A célula fúngica

Os fungos são organismos eucarióticos e com parede celular. A parede celular é composta por um polímero de N-acetil-glicosamina, a quitina. Quitina é um composto também encontrado em artrópodos, mas neste caso como componente do exoesqueleto e não da célula. A quitina em fungos pode ser encontrada em duas formas, a fase amorfa e a cristalina. Em sua forma amorfa, presente geralmente nas regiões de crescimento da hifa, a quitina tem constituição plástica, sendo muito maleável. A forma cristalina encontrada na parede celular madura é extremamente rígida. O crescimento da hifa se dá pela deposição constante de quitina amorfa na ponta da hifa em crescimento. A polimerização cruzada entre as microfibrilas de quitina vai com o passar do tempo conferindo à quitina a sua forma cristalina e rígida. Como a deposição se dá preferencialmente no ápice da célula a hifa tende a crescer ordenadamente a partir de seu ápice, resultando em uma célula tubular. Leveduras cilíndricas por outro lado depositam os componentes de parede por toda a sua extensão, resultando numa célula arredondada. Leveduras alongadas apresentam uma distribuição intermediária. Leia o texto de Bartinick-Garcia (1999, artigo na página do curso), que explica a morfogênese da célula fúngica. Além de quitina outros polissacarídeos também se encontram associados na parede do fungo, notadamente alfa e beta glucanas e mananas.

A parede fúngica é recoberta por um material mucilaginoso, a matrix extracelular, que auxilia na adesão do fungo ao substrato, retém na vizinhança da célula o material excitado evitando a difusão excessiva

de solutos e mantém um microambiente adequado ao crescimento dos organismos.

A membrana fúngica de maneira similar às membranas eucarióticas é formada por uma bicamada fosfolipídica, entretanto o ergosterol é o esterol de membrana predominante. Isso possui importância prática, pois células animais não contêm ergosterol, e portanto medicamentos que inibam a síntese de ergosterol podem ser utilizados, prejudicando os fungos patogênicos mas não os seus hospedeiros.

Fungos possuem um citoesqueleto composto por microfilamentos e microtúbulos. Normalmente o tráfego de vesículas e organelas rápidas é feito pelo arcabouço de microfilamentos de actina, enquanto organelas maiores se movimentam sobre os microtúbulos de tubulina.

Células fúngicas podem ser mono, di ou multinucleadas. Normalmente em sua fase vegetativa os fungos possuem núcleos haplóides. O número de cromossomos é espécie específica. Os cromossomos são lineares e o material genético está complexado a proteínas formando nucleossomos. Não se observam centríolos em fungos, mas frequentemente apresentam inclusões nucleares de actina (Figura 11). A carioteca apresenta poros e está intimamente associada ao retículo endoplasmático, e este pode ou não apresentar ribossomos associados. O complexo de Golgi é normalmente único e é o sítio de glicosilação de proteínas. Os ribossomos possuem, como os eucariotos, uma velocidade de sedimentação de 80S com exceção dos ribossomos mitocondriais, que possuem ribossomos 70S. As mitocôndrias são inúmeras e distribuídas próximas à porção apical da hifa em fungos filamentosos.

Fungos apresentam vacúolos em sua porção distal. Glicogênio e grânulos de lipídios são frequentemente observados. Células fúngicas podem ou não conter septos, os quais são paredes transversais que separam células contíguas. Esses septos podem ser simples, fenestrados ou complexos. Os septos complexos podem ser de dois tipos: os que possuem inclusões densas próximas ao orifício do poro (corpos de Woronin), ou aqueles em que existe uma estrutura, normalmente porosa, que recobre o poro, estes são chamados comumente de doliporos (Figura 7). Outra estrutura particular aos fungos é o Spitzenkörper, um aglomerado de vesículas que normalmente aparece negra em microscopia de contraste de fase e que possui grande importância na morfogênese da parede fúngica (Figura 11).

Normalmente as vesículas do Spitzenkörper migram até a membrana plasmática, com a qual se fundem e exteriorizam os seus conteúdos que podem ser os precursores da elongação da parede ou enzimas digestivas. Como a célula fúngica apresenta elevada pressão de turgor, a deposição constante de material de parede amorfo em sua

ponta gera uma constante alongação da célula e no caso de um fungo filamentosos resultará em uma célula cilíndrica; se, por outro lado, a deposição de novo material de parede se der distribuído por toda a superfície interna da parede, o resultado será uma célula de forma circular.

Bactérias

Definição

Bactérias são organismos procarióticos, geralmente unicelulares, sem organelas envelopadas, com parede rígida, complexada ou não a membranas externas.

As bactérias constituem um grupo de organismos extremamente diverso. A sua caracterização e separação se dá tanto por características morfológicas como bioquímicas e fisiológicas. Morfológicamente, além da forma das células (coccus, bastonetes, espirilos, vibriões etc.), a reação à coloração pelo teste de Gram (Anexo 6) também é utilizada para a separação de diferentes espécies bacterianas. Entretanto a variabilidade morfológica de bactérias é muito inferior a variabilidade de espécies destes organismos, portanto características bioquímicas, fisiológicas e moleculares são utilizadas corriqueiramente para a separação de espécies. Atualmente, por estas características, as bactérias estão divididas em 4 grupos: os **Gracilicutes** (bactérias que reagem negativamente à coloração de Gram); os **Firmicutes** (Bactérias Gram positivas); os **Tenericutes** (procariotos sem parede rígida); e os **Mendosicutes** (procariotos com parede sem peptidoglicanos – *archeobacteria*). Comumente os procariotos são divididos em dois grupos, as eubactérias e as *archeobacterias*. Apesar de nem todos possuírem um núcleo envelopado, as *archeobacterias* compartilham uma série de características que as fazem mais próximas dos eucariotos do que dos procariotos (Tabela 1). Discuta com os seus colegas a afirmação de que *archeobacterias* são mais próximas aos eucariotos do que aos procariotos – Para substanciar a discussão, leia o material presente na página do curso na Internet.

Tabela 1

Principais similaridades e diferenças entre Eubactérias, Archeobactérias e Eucariotos.

Similaridades entre Archeobacterias, Eubacterias e Eucariotos			
	Eubacteria	Arqueobacterias	Eucariotes
Núcleo	Não	Não	Sim, envelopado
Nucleossomos/histonas	Não	Sim	Sim
Operons/mRNA Policistronico	Sim	Sim	Não
Introns	Não	Não	Sim
Proteína ligada ao TATA Box	Não	Sim	Sim
Organelas	Não	Não	Sim.
Cromossomos	Um Circular	Um Circular	Mais de um
RNA polimerase	Uma (simples)	Várias (complexas)	Várias (complexas)
Aminoácido iniciador de síntese de Proteínas	N-formil metionina	Metionina	Metionina
Sensível à toxina diftérica	Insensível	Sensível	Sensível
Peptidoglicano	Sim	Não	Não

Estruturas bacterianas

Bactérias normalmente crescem por divisão binária, assim uma célula mãe dará origem a uma célula filha; como a célula mãe continua viável e pode se dividir novamente, a célula mãe e filha formarão novas células bacterianas caracterizando um crescimento exponencial. A velocidade de crescimento em condições adequadas pode ser muito rápida, chegando em alguns casos a uma divisão a cada 20 minutos. Dependendo do tempo em que a célula inicia o processo de divisão e o tempo necessário para a separação das células mãe e filha, várias formas bacterianas podem se formar. Assim, se as células tendem a se dividir num plano único, as células geradas ficaram dispostas em cadeias lineares, o que normalmente é chamado de forma Estrepto. Se a célula for arredondada, ou em forma de coccus, se formará a forma Streptococcus; se a célula for alongada (bacillus), teremos o Estreptobacilo. Se a divisão se der em planos diversos, em vez de um cordão de células teremos uma forma similar a um “cacho de uvas”, o que conhecemos como a forma Estafilo, resultando na forma Estafilococcus no caso de uma célula circular. Divisão em planos alternados gerarão arranjos em cubos, como as Sarcinas, etc. (Figura 12).

Fisiologia bacteriana

Bactérias podem ser encontradas em todos os ambientes e apresentam grande diversidade de formas de crescimento. Elas podem ser divididas didaticamente quanto às necessidades tróficas e resistência ao oxigênio. Assim encontraremos as bactérias heterotróficas e autotróficas, as anaeróbicas, as aeróbicas e as anaeróbicas facultativas.

Bactérias heterotróficas são aquelas que necessitam de fontes exógenas de carbono complexo para se desenvolver. Devido a esta necessidade, muitas dessas bactérias são saprófitas ou parasitas.

Bactérias autotróficas são aquelas que a partir de luz, CO_2 ou outras fontes inorgânicas são capazes de gerar energia para o seu próprio desenvolvimento. As que obtêm energia diretamente da luz são denominadas fotoautotróficas ou fotoheterotróficas dependendo se utilizam como fonte de carbono fontes inorgânicas (CO_2) ou orgânicas. Aquelas que retiram energia de compostos orgânicos e carbono de fontes inorgânicas são denominadas litoautotróficas, enquanto as que se utilizam de fontes de energia e carbono orgânicos são denominadas quimioheterotróficas (Tabela 2).

Tabela 2
Principais tipos nutricionais em bactéria

Tipo Nutricional	Fonte de Energia	Fonte de Carbono	Exemplos
Fotoautotróficos	Luz	CO_2	Cyanobacteria, algumas Bacteria Verde-azuladas
Fotoheterotróficos	Luz	Compostos Orgânicos	Algumas Bacteria Verde-azuladas
Litoautotróficos	Compostos Inorgânicos $\text{H}_2, \text{NH}_3, \text{NO}_2, \text{H}_2\text{S}$	CO_2	Algumas Eubacterias e muitas Arqueobactérias
Quimioteterotróficos	Compostos orgânicos	Compostos Orgânicos	Muitas Eubacterias, algumas Arqueobactérias

Bactérias aeróbicas são aquelas que se desenvolvem em ambientes necessariamente na presença de O_2 em níveis compatíveis com a concentração de 21% (concentração normal do oxigênio na atmosfera). Geralmente bactérias deste grupo são oxidase positiva, ou seja, respondem ao teste da oxidase (Anexo 5).

Bactérias anaeróbicas por outro lado não se desenvolvem na presença de O_2 . O oxigênio é um gás altamente reativo, oxidando componentes celulares. Bactérias anaeróbicas não possuem maneiras de evitar os efeitos deletérios do oxigênio. Por exemplo, as bactérias anaeróbicas não possuem a enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogênio. (Veja o teste da catalase no Anexo 5.)

Bactérias microaerófilas. Este grupo suporta a presença de oxigênio e cresce em sua presença apenas em concentrações abaixo de 21%.

Bactérias anaeróbicas facultativas podem crescer tanto na presença como na ausência de oxigênio. Normalmente crescem melhor em condições aeróbicas.

Um teste usual para evidenciar a presença de bactérias aeróbicas, anaeróbicas ou facultativas é a inoculação na profundidade e super-

fície de um meio sólido inclinado TSI. Um outro método bastante utilizado para a diferenciação de aeróbios e anaeróbios é o teste do Tioglicolato (veja o teste do glicolato e analise as suas deficiências – Anexo 5).

Bactérias podem ser encontradas desenvolvendo-se em diferentes temperaturas. Assim, bactérias que se desenvolvem de 0 a 15 °C são denominadas psicrófilas, aquelas que podem crescer entre 15 e 40 °C são denominadas mesófilas e aquelas que crescem em temperaturas entre 40 e 70 °C são chamadas de termófilas. Obviamente existem bactérias que se desenvolvem nestas faixas de temperatura mas possuem um ótimo de crescimento em outras faixas. Assim, bactérias que conseguem crescer em temperatura de geladeira, mas possuem um ótimo de crescimento a 37 °C são denominadas psicrófilas. Como visto, a comunidade de bactérias é extremamente versátil e hábil em se desenvolver numa grande gama de condições bioquímicas e fisiológicas. Devido a esta característica encontraremos bactérias crescendo em fontes termais a uma temperatura superior a 80 °C, ou nos círculos polares, em ambientes hipersalinos ou com compostos normalmente tóxicos etc.

A célula bacteriana

Como todo procarioto, não existem em células bacterianas nenhuma organela circunscrita por membrana. O material nuclear esta disperso no citoplasma, mas mantêm-se conectado à membrana plasmática da célula pelo mesossomo. O mesossomo é uma estrutura protéica complexa formada por dobras do plasmalema e é onde enzimas de replicação de material nucléico se localizam. Os cromossomos são circulares e não complexados a proteínas em eubactérias. Já as *archeobacterias* possuem histonas complexadas ao DNA. Tanto eubactérias quanto *archeobacterias* possuem um único cromossomo com uma única origem de replicação. Bactérias possuem ribossomos abundantes, tanto isolados como formando poliribossomos. A sua velocidade de sedimentação em gradiente de Césio é de 70S, diferentemente dos eucariotos cujos ribossomos são 80S. Citoesqueleto não é observado, apesar de existirem indícios moleculares da presença de proteínas similares à actina. A membrana plasmática geralmente não possui esteróis. Como não existem organelas membranosas em células bacterianas, quando presentes, o material de reserva, principalmente lipídeos, está depositado em inclusões citoplasmáticas. Possivelmente a estrutura mais extraordinária de bactérias é a parede celular. A sua composição é muito diversa e é uma característica importante para a separação dos diversos grupos de bactérias. A parede é a estrutura responsável pela morfologia celular e muitas funções fisiológicas são realizadas em sua superfície. O componente

principal da parede celular na maioria das bactérias é o peptidoglicano, também conhecido como mureína, que através de diversas ligações cruzadas produz um polímero extenso que confere rigidez à célula bacteriana (Figura 13). O peptidoglicano é composto por dois açúcares aminados ligados covalentemente, o ácido N-acetil-glicosamina e o N-acetil-murâmico. A partir da molécula de N-acetil-glicosamina liga-se a porção peptídica do peptidoglicano, normalmente composta por uma cadeia de 4 ou 5 aminoácidos. Os monômeros de peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e carreados através da membrana celular por uma molécula de membrana chamada bactoprenol (Figura 13). A inserção destes monômeros na parede produzem a elongação da estrutura resultando nos processos de divisão binária (veja o texto no site do curso explicando o processo de inclusão dos monômeros de peptidoglicano na parede). A parede das *archeobacterias* entretanto não apresenta peptidoglicano, mas sim lipoproteínas e carboidratos. Entre as eubactérias a espessura da camada de peptidoglicana é variada. Algumas bactérias possuem apenas uma ou poucas camadas de peptidoglicanas, enquanto outras possuem várias camadas de peptidoglicano resultando em paredes espessas.

As características das paredes bacterianas foram inicialmente estudadas por Hans Christian Gram em 1882 (resultados publicados em 1884). Gram descreveu um método de coloração de células bacterianas (Anexo 6) que permitiam a visualização e separação das bactérias em dois grupos, que hoje são chamadas de Gram positivas e negativas. O teste é feito pela adição às células bacterianas do corante de Gram (cristal violeta, também conhecido como violeta de Genciana; em alguns protocolos o cristal violeta pode ser substituído pelo azul de metileno). A capacidade da célula em reter o corante é a base do teste de Gram. Basicamente algumas células perdem facilmente o corante quando expostas a uma solução de solvente orgânico (geralmente éter-acetona). Como a liberação do corante se dá na presença de um solvente, mas a célula mantém a sua integridade, Gram sugeriu que a parede bacteriana do grupo Gram⁻ era rígida e recoberta por uma camada lipídica. O teste funciona da seguinte maneira. As células bacterianas são coradas igualmente pelo cristal violeta, adquirindo uma coloração azulada. A estas células é adicionado o mordente lugol (substância que ajuda a manter a cor da célula). Lugol é uma solução de iodo, que reage com o cristal violeta formando um complexo cristal violeta-iodo. Este complexo é menos permeável que o cristal violeta sozinho. Após este tratamento as células bacterianas são lavadas a éter-acetona. Em células Gram⁻ o corante é removido, pois a membrana externa da bactéria é dissolvida pelo solvente orgânico e a pequena espessura da camada de peptidoglicano não oferece barreira eficaz à saída do corante. Já em células Gram⁺ a camada espessa de peptidoglicano é desidratada pelo solvente e tem a sua permeabili-

dade ainda mais diminuída; como resultado o corante não é liberado na mesma velocidade do que o observado em células Gram⁻. As células Gram⁻ agora estão incolores e necessitam ser contra-coradas com uma solução de safranina ou fuccina para serem visualizadas. Apesar do exposto, a coloração de Gram é sensível a vários fatores. Por exemplo, apesar da velocidade de liberação do cristal violeta ser diferente entre células Gram⁺ e Gram⁻, ambos perdem corante durante a lavagem com a solução de éter-acetona. Assim, se o tempo de tratamento com o solvente orgânico for exagerado, ambas as células se descorarão, resultando em coloração Gram⁻ independente da natureza da célula, ou seja, um falso negativo.

A arquitetura da parede de uma célula Gram⁺ é constituída basicamente por várias camadas de peptidoglicano ligadas de maneira cruzada resultando em uma parede espessa. Uma parede de uma célula Gram⁻, por outro lado, possui apenas uma ou poucas camadas de peptidoglicano que é recoberto por uma bicamada lipídica formando uma membrana externa. Externamente à membrana externa a célula pode apresentar uma deposição de material lipopolissacarídeo (LPS). Este material confere à célula um envoltório mucilaginoso e que em alguns patógenos serve como mecanismo de virulência. O espaço contido entre a membrana interna e a externa e contendo a camada de peptidoglicano é denominado espaço periplasmático. A parede bacteriana pode possuir adereços como cílios e flagelos que são importantes para adesão e locomoção. Flagelos de bactérias, diferentemente de flagelos eucariotos, não possuem movimento ondulatório, mas circular, e são compostos pela proteína flagelina. Estruturalmente o flagelo (Figura 13) é constituído pela cauda ou filamento, gancho e complexo de parede, ancorado na camada de peptidoglicano e membrana. O flagelo de eubactérias apresenta um movimento circular a partir de um mecanismo de produção de energia protônico enquanto *archeobacterias* geram energia para o seu deslocamento a partir da energia gerada pela quebra de moléculas de ATP.

AUTO-AVALIAÇÃO

Por favor responda as seguintes questões:

Questão 1:

Como diferenciar uma célula fúngica de uma bacteriana?

Questão 2:

Para o controle de infecções, geralmente estruturas do patógeno, não presentes no hospedeiro, são utilizadas como alvo para a ação do fármaco. Quais alvos você utilizaria em células bacterianas?

Questão 3:

Quais as principais diferenças entre células Gram positivas e negativas?



FIGURA 1: Laranja injuriada para inoculação natural com patógenos do ar. Repare que o albedo (parte branca da laranja) está exposta. Seta



FIGURA 2: Aparato para incubação de laranjas inoculadas com patógenos do ar. Note o suporte (copo de café descartável) na base de um recipiente plástico (caixa descartável de plástico). O recipiente deve conter água em sua base

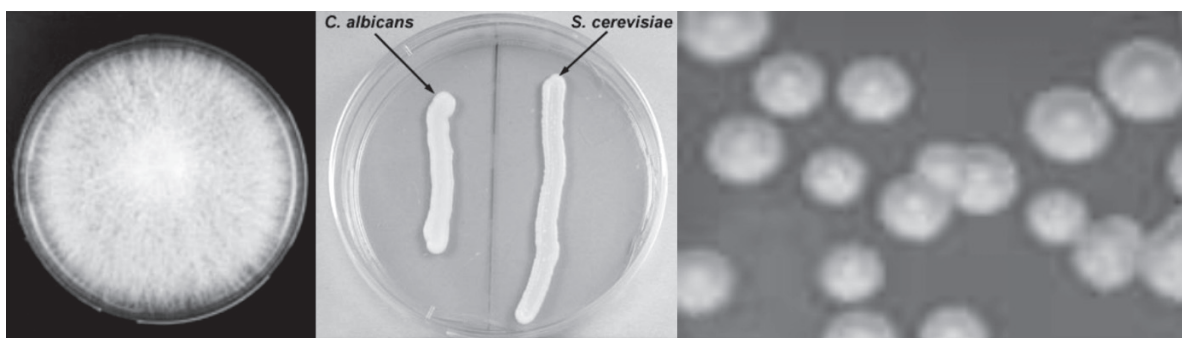


FIGURA 3 (da esquerda para direita): Colônia filamentososa (A) e lisa (B) com levedura e colônias bacterianas (C)

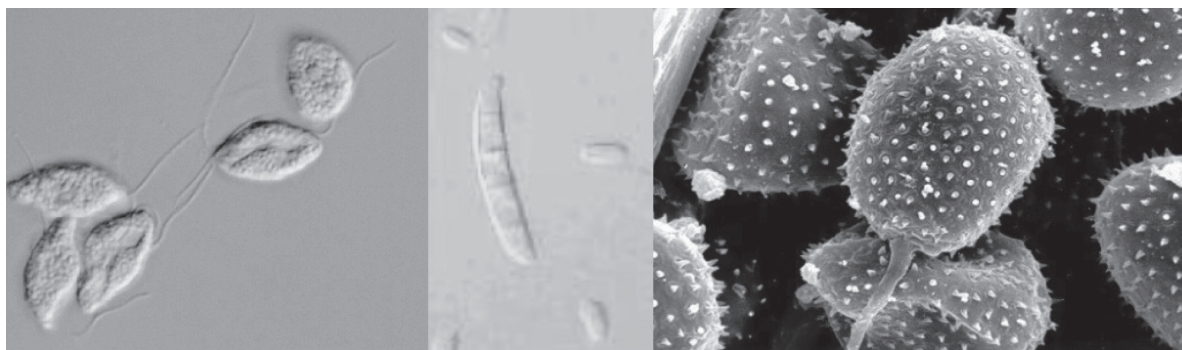


FIGURA 4 (da esquerda para direita): Tipos de esporo fúngico. a) zoósporo – Note os flagelos alongados; b) Macroconídios multicelulados e alongados e microconídeos unicelulares; c) esporos anemófilos – note as espículas em sua superfície

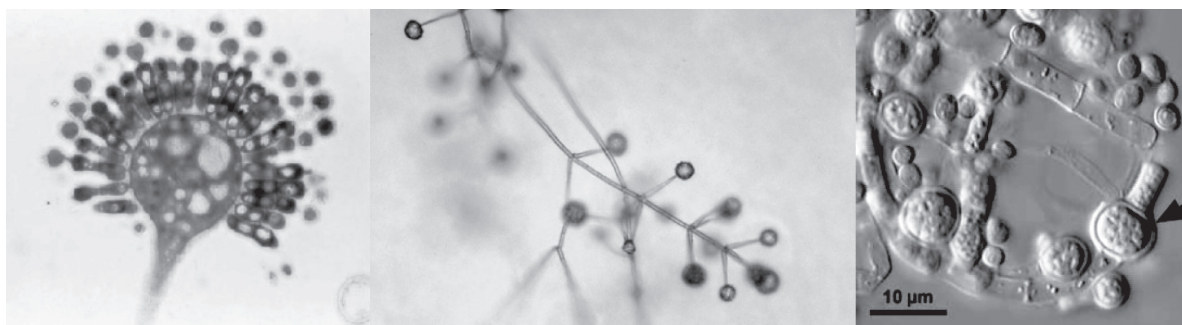


FIGURA 5 (da esquerda para direita): Conidióforo do fungo *Aspergillus* sp (a) e *Verticillium* (b). Clamidósporos intercalares (c)

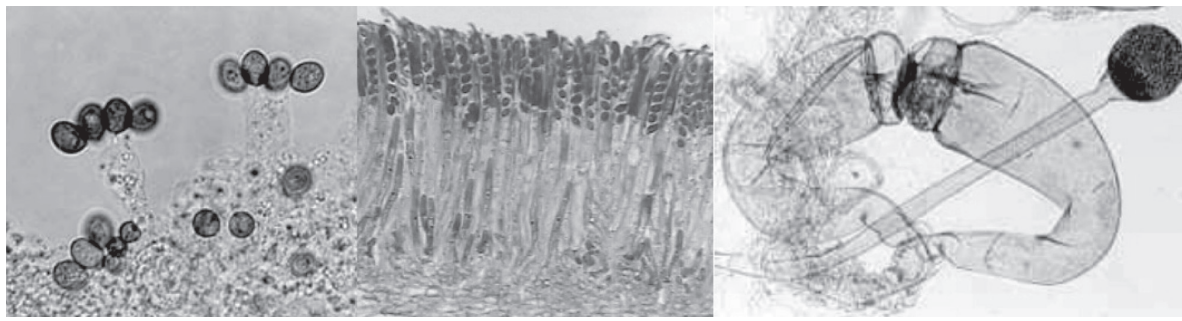


FIGURA 6 (da esquerda para direita): Basidiósporos (a); Ascósporos (b) e Esporângio (c)



FIGURA 7 (da esquerda para direita): Hifas septadas do fungo de solo *Rhizoctonia solani* (a); (b) Doliporo de um basidiomiceto. Note a cobertura perfurada em volta do poro. (c) Poro (seta) com corpo de Woronin, típico de ascomicetos

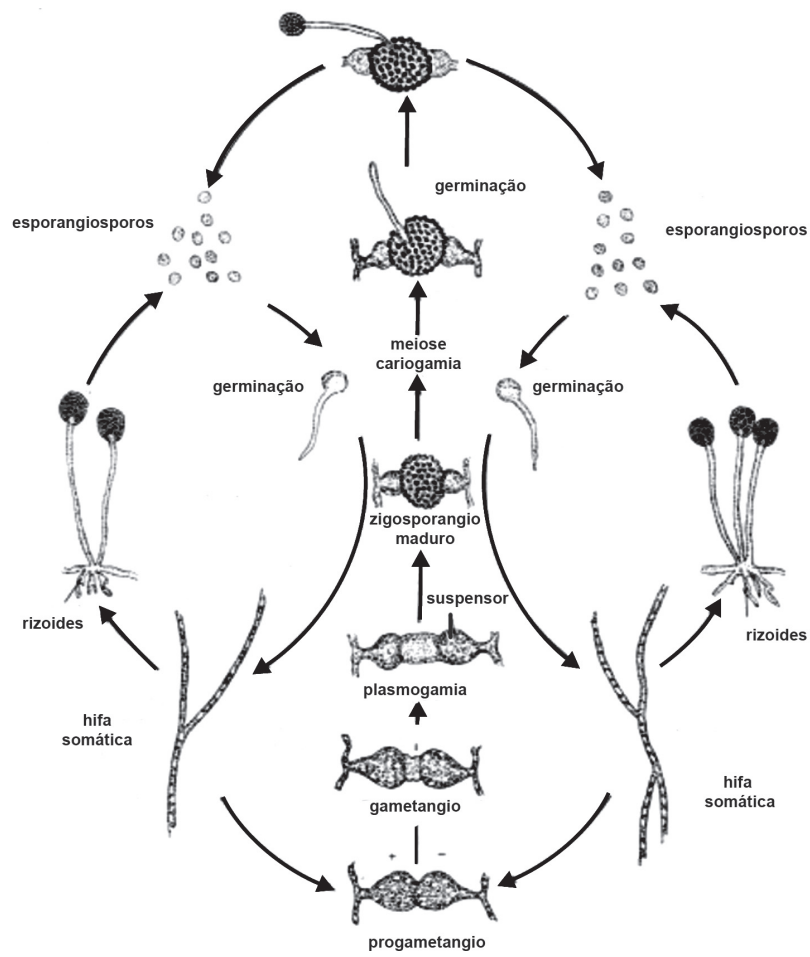


FIGURA 8: Ciclo de vida do bolor negro do pão (*Rhizopus nigri*)

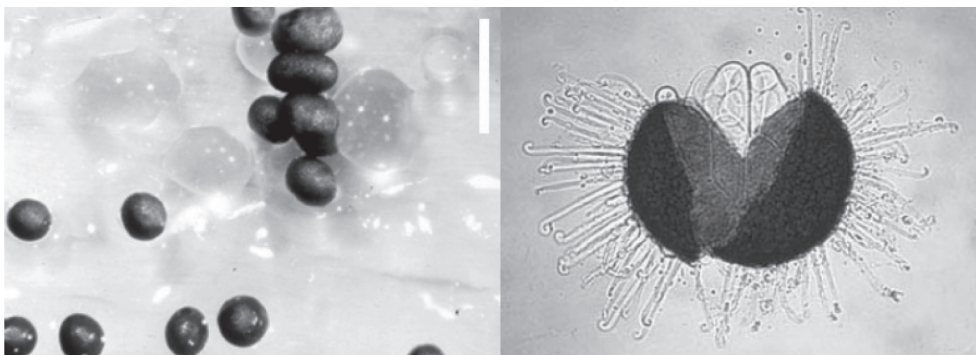


FIGURA 9 (da esquerda para direita): Esclerócito formado por enovelamento de hifas (a) e (b). Cleistotécio com ascas

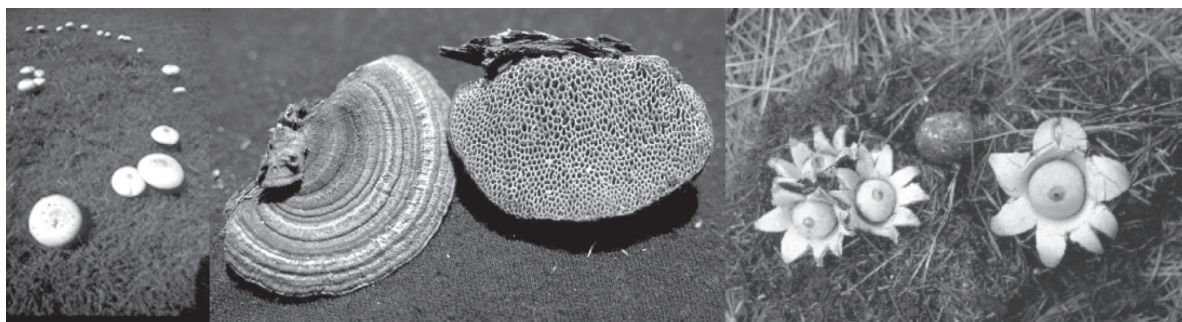


FIGURA 10 (da esquerda para direita): Basidiocarpos fúngicos (a) cogumelos, (b) orelhas de pau, (c) estrelas da terra

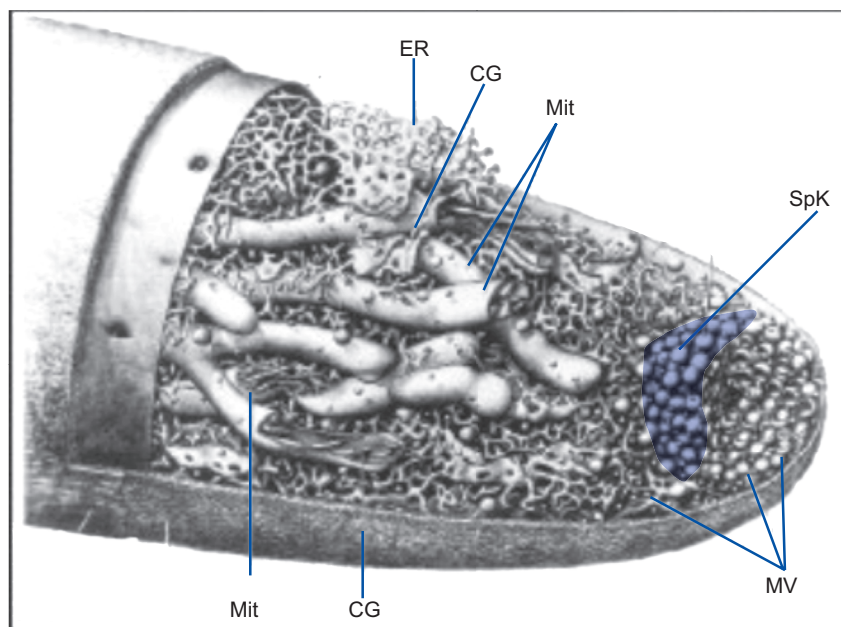


FIGURA 11: Desenho esquemático de uma célula fúngica. MV = Microvesículas, Mit = mitocôndria, SpK = Speizenkorper, CG = complexo de Golgi, ER = Reticulo endoplasmático

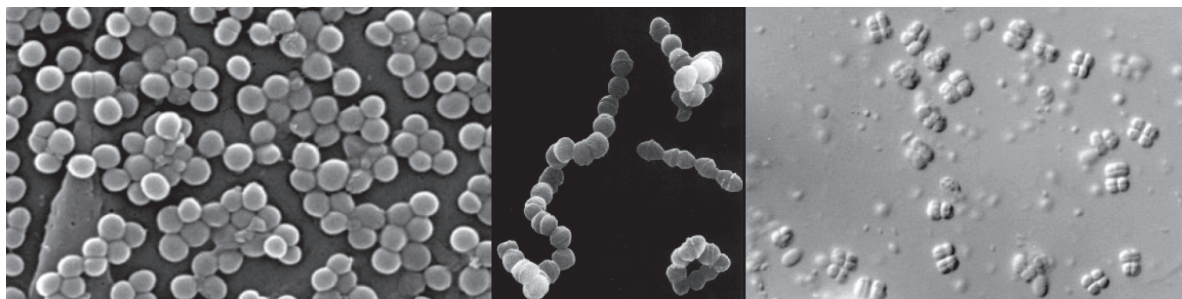


FIGURA 12 (da esquerda para direita): Tipos celulares bacterianos a) Estafilococos, b) Estreptococos, c) Sarcina

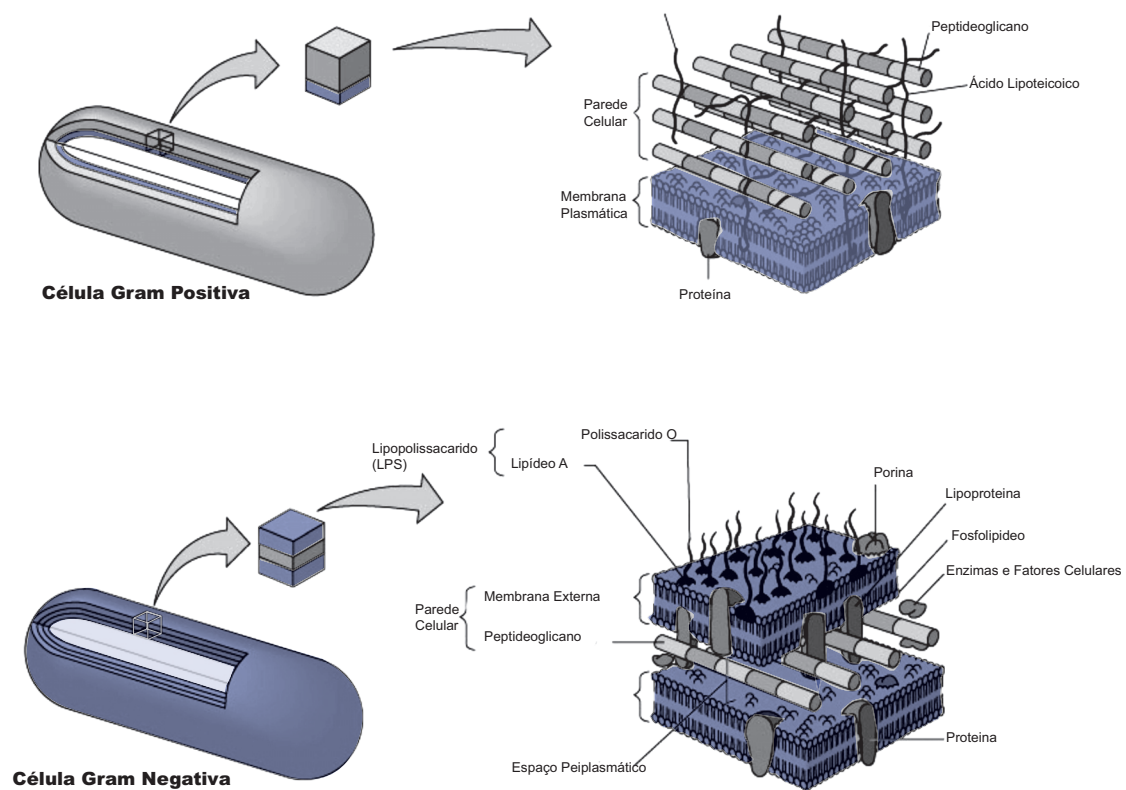


FIGURA 13: Desenho esquemático de uma célula Gram Positiva e Negativa

Vírus

INTRODUÇÃO

Vírus são partículas de material nucléico, complexados ou não a proteínas, que necessitam obrigatoriamente de uma célula hospedeira para a sua multiplicação. A morfologia e tamanho dos vírus é variada. O seu tamanho varia entre 20 e 14.000 nm e formas arredondadas, alongadas e mistas são observadas.

A palavra vírus é originária do latim e significa veneno. O primeiro vírus purificado e caracterizado foi o vírus do mosaico do tabaco em 1935 por Wendell M. Stanley, no departamento de fitopatologia da Universidade de Princeton, nos Estados Unidos. Os achados de Stanley causaram um grande impacto na ciência, auxiliando na compreensão do papel do material nuclear na transferência de características hereditárias, sendo os trabalhos agraciados com o prêmio Nobel de química em 1946.

Por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, os vírus estão geralmente associados a doenças, mas infecções virais assintomáticas são freqüentes. Todos os tipos celulares são passíveis de infecção por um vírus, sendo observadas infecções em algas, fungos, bactérias, plantas, protozoários e células animais. Vírus podem apresentar diferentes graus de especificidade, alguns sendo especializados em infectar um único tipo celular, até outros que podem infectar diferentes organismos. Discutiremos a seguir, a partir do modelo de infecção de um vírus em uma célula bacteriana, as diferentes particularidades dos vírus.

BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos são partículas virais que infectam e se multiplicam no interior de células bacterianas. Para tanto é necessário que: as partículas do bacteriófago se liguem na parede da bactéria hospedeira; introduzam seu material nuclear no interior do microrganismo;

novas cópias do material nuclear e capa protéica sejam produzidas; estas subunidades virais sejam arrançadas de modo a formarem novas partículas virais maduras, que serão liberadas ao ambiente e, novamente, infectam outros hospedeiros.

Material e Métodos

Transfira 100 µl de uma solução de bacteriófagos previamente diluído para uma concentração de 10^{-2} (100 µl em 10 ml de caldo de cultura) para 0,9 ml de caldo simples. A partir desta solução transfira novamente 100 µl para um novo tubo contendo 0,9 ml de caldo simples. Como resultado você terá agora uma solução estoque a 10^{-2} , 0,9 ml de uma solução de bacteriófago diluído a 10^{-3} e 1 ml de uma solução de bacteriófago diluído a 10^{-4} . A partir desta solução a 10^{-4} repita a operação até obter diluições de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Despreze 0,1 ml da solução a 10^{-7} para que todos os tubos contenham agora 0,9 ml. Transfira para todos os tubos 0,1 ml de uma solução de *Escherichia coli* e incube esta preparação por 10 min. na bancada. Após a incubação transfira 0,1 ml das soluções diluídas para placas de Petri contendo o meio de lisado (caldo simples, 1% glicose e 1% indicador de Andrade) sólido e espalhe o líquido por toda a superfície da placa. Incube a 37°C por 24 h e observe a formação de taches (áreas circulares sem o crescimento bacteriano). Incube também nas mesmas condições os tubos com as diluições de bacteriófagos.

Observação dos resultados

Todos os tubos apresentam o mesmo aspecto? Por que não?

Todas as placas apresentam o mesmo número de taches?

Você é capaz de calcular quantos bacteriófagos existiam na solução inicial?

O que é título?

Nas menores diluições você observou o crescimento de pequenas colônias? O que são estas colônias?

MORFOLOGIA E ESTRUTURA VIRAL

Os vírus apresentam uma capa protéica e material genético (Figura 15). A capa protéica é formada a partir de subunidades chamadas capsômeros que se unem formando o capsídeo. O conjunto capsídeo-material nuclear é chamado núcleo-capsídeo ou vírion. Alguns vírus apresentam sobre o seu núcleo-capsídeo uma membrana externa, geralmente com proteínas intercalares, denominado envelope. O material nuclear, também chamado de viróide, pode ser constituído de DNA, RNA, DNA de fita simples (em senso ou antisenso) ou RNA de fita dupla.

Quanto à forma os núcleo-capsídeos podem ser alongados, icosaédricos ou possuir morfologia complexa.

Os vírus alongados, também chamados de helicoidais, são formados a partir de capsômeros que se ligam em seqüência formando uma forma de hélice (Figura 14). Já os icosaédricos possuem a forma de um poliedro de 20 faces triangulares (Figura 14). Os vírus complexos apresentam uma forma que contempla as duas formas anteriores (Figura 14). Alguns vírus apresentam espículas em sua superfície que funcionam como receptores e auxiliam na fixação e infecção dos vírus na célula hospedeira. Uma característica importante dos capsômeros é que nas condições ideais, na presença do material nuclear adequado ocorre a auto-montagem do núcleo-capsídeo, sem a necessidade de gasto energético.

A classificação dos vírus pode ser feita pelo tipo de material nuclear que ele possui; assim, vírus do grupo I possuem DNA de fita dupla, os do grupo II, DNA de fita simples, grupo III, RNA de fita dupla, grupo IV, RNA de fita simples em sentido, grupo V, RNA de fita simples em anti-senso, grupo VI, RNA com transcrição reversa, grupo VII, DNA com transcrição reversa e o grupo final com agentes subvirais como vírus satélites, viróides etc. Vírus satélites são vírus que não conseguem se replicar sem a presença de um outro vírus auxiliar.

CICLO DE VIDA VIRAL

Dependendo do tipo de material genético o vírus apresenta o seu modo de replicação diferente, mas, grosso modo, todos apresentam um ciclo de vida similar que começa com a adsorção da partícula viral à célula do hospedeiro, a penetração na célula hospedeira, o desnudamento, replicação e liberação.

Adsorção

A adsorção é o processo de ligação de estruturas específicas do vírus a receptores na célula hospedeira. Normalmente em vírus envelopados estas estruturas de reconhecimento estão presentes na membrana externa vírica (Figura 15). Em vírus nus (não envelopados) as espículas presentes no capsídeo fazem esta função. Alguns vírus que são introduzidos diretamente na célula hospedeira por vetores não possuem estruturas de adsorção. Isto é comum entre vírus que infectam fungos e plantas. Nestes organismos a parede celular funciona como uma barreira que impede o acesso do vírus à membrana plasmática. Normalmente a infecção viral nestes organismos se dá através de injúrias na célula ou pela ação de insetos sugadores. Vírus que infectam bactérias possuem fibras na cauda (Figura 14) que possuem proteínas específicas para fixação na parede bacteriana.

Penetração

Após a adsorção o vírus pode entrar na célula hospedeira por endocitose mediada por receptores. Após a ligação do vírus ao plasmalema do hospedeiro, ocorre a formação de uma envaginação da membrana e formação de um endossomo, que englobando a partícula viral carreará o vírus para dentro do citoplasma (Figura 15). Uma outra maneira de penetração é a fusão de membranas entre o envelope viral e o plasmalema, resultando na incorporação do envelope no plasmalema e liberação do núcleo-capsídeo no citoplasma. Ainda uma terceira via de penetração é a observada em bacteriófagos, que após a adsorção encurtam a sua cauda e introduzem apenas o seu material genético no interior do citoplasma.

Desnudamento

No caso de vírus que introduzem o núcleo-capsídeo no citoplasma da célula hospedeira, para que o material genético viral possa se replicar, é necessário que o capsídeo seja degradado, liberando o vírion. Isto pode ser feito no interior do complexo endossomo-lisossomo nos vírus que penetram por endocitose, ou no citoplasma por proteases de origem viral ou do hospedeiro.

Replicação

O processo de replicação pode ocorrer no citoplasma ou núcleo do hospedeiro, dependendo do vírus em questão. Dependendo do tipo de material genético do vírus, o processo de replicação será diferente, a saber.

Vírus do grupo I - DNA fita dupla

Dois tipos básicos de replicação podem ocorrer neste grupo de vírus: replicação citoplasmática, na qual o vírus possui todos os genes para a sua própria replicação e transcrição que ocorre no citoplasma, e a nuclear, na qual a replicação ocorre em várias etapas com a formação de proteínas precoces e tardias.

Vírus do grupo II - DNA de fita simples em senso

A replicação é nuclear e envolve a formação de uma fita complementar em anti-senso para a replicação e transcrição. São necessários mediadores da célula para o processo.

Vírus do grupo III - RNA de fita dupla

Estes vírus possuem genomas segmentados, com cada segmento sendo transcrito separadamente produzindo RNAs monocistrônicos, que resultarão em proteínas funcionais.

Vírus do grupo IV - RNA de fita simples em sentido

Estes vírus podem ser processados de duas maneiras; através de um RNA policistrônico que, no caso, é o próprio genoma do vírus e resulta numa poliproteína que será clivada e pós-processada em proteínas funcionais ou através de uma transcrição complexa em que a primeira rodada de transcrição produzirá o RNA polimerase necessária para a replicação do RNA genômico do vírus.

Vírus do grupo V - RNA de fita simples em anti-senso

Estes vírus podem possuir genomas segmentados (monocistrônicos) ou não segmentados (policistrônicos). Em ambos os casos a formação do RNAm é feito pelo RNA polimerase - RNA dependente, que faz parte do vírion e resultará na formação de genomas em sentido que servirão de modelo para a replicação do genoma viral.

Vírus do grupo VI - RNA de fita simples em sentido com um intermediário de DNA

Estes vírus utilizam a enzima transcriptase reversa (parte do vírion) que replicará o genoma de RNA de fita simples em DNA de fita dupla, o qual servirá de modelo para a produção de novo RNA de fita simples e transcrição de proteínas do vírus.

Vírus do grupo VII - DNA de fita dupla com um intermediário de RNA

Nestes vírus a replicação e transcrição do vírus ocorre como um vírus de DNA fita dupla, mas a replicação do DNA se dá pela transcriptase reversa usando o RNA de fita anti-senso como modelo.

Montagem

Muitos vírus se montam espontaneamente, ou seja, sem a necessidade de fontes de energia. É sabido que uma mistura de proteínas do capsômero do vírus do mosaico do tabaco e seu RNA, espontaneamente, geram partículas virais completas. Alguns vírus entretanto necessitam de fatores não estruturais sintetizados durante a replicação viral para a correta montagem da partícula viral. Estes fatores são chamados de chaperones moleculares.

Liberação

A liberação da partícula viral pode se dar pela lise da célula hospedeira e conseqüente liberação das partículas extracelularmente ou pelo brotamento da partícula viral pela membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 15). Vírus que se multiplicam em células com parede podem também ser transportados de um hospedeiro para outro através de vetores, como insetos. Alguns vírus vegetais ainda podem ser dispersos através de grãos de pólen ou sementes.

AUTO-AVALIAÇÃO

Por favor responda as seguintes questões:

Questão 1:

Discuta com os seus colegas as diferenças entre os ciclos de multiplicação viral.

Questão 2:

Se os vírus utilizam o maquinário celular para a sua multiplicação, como evitar que isto ocorra sem danificar a célula hospedeira?

Questão 3:

Na página do curso existe uma figura das subunidades de um vírus que serve como modelo em papel de um vírus icosaédrico. Monte a estrutura e discuta com os seus colegas o porquê de partículas virais possuírem geralmente 20 lados.

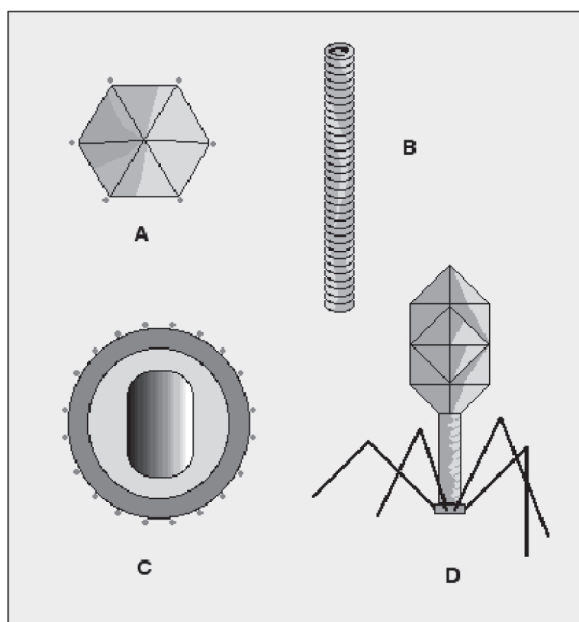


FIGURA 14: Tipos de vírus: A) vírus esféricos – icosaédricos, B) vírus alongados, C) vírus envelopados, D) bacteriófagos

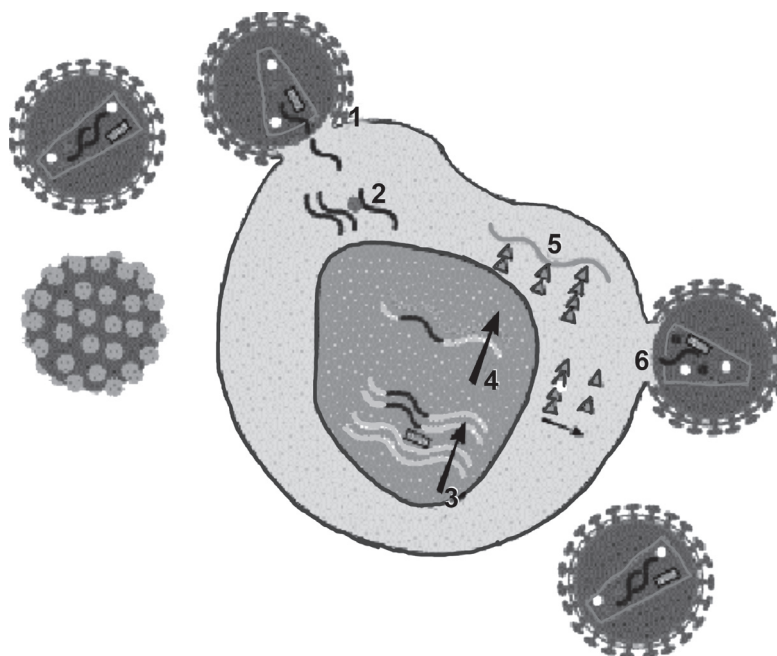


FIGURA 15: Ciclo viral - HIV 1) adesão e encapsulamento; 2) Replicação (no caso do HIV com a formação de uma fita de DNA a partir de uma cópia de RNA pela enzima transcriptase reversa; 3) migração da fita de DNA para o núcleo e incorporação ao genoma do hospedeiro; 4) transcrição e replicação viral; 5) montagem do vírus no citoplasma e 6) brotamento

Microorganismos e Ciclos Biogeoquímicos

A ciclagem de nutrientes no ambiente é grandemente influenciada pela comunidade microbiana. Alguns nutrientes inclusive não poderiam ser reciclados sem a presença dos microrganismos.

Descreveremos com mais detalhe o ciclo do nitrogênio e a contribuição que microrganismos têm na disponibilização destes compostos no ambiente. Este ciclo é ilustrativo e serve de modelo para outros ciclos biogeoquímicos. Um exercício interessante e pedagógico é a descrição por parte do aluno de outros ciclos, como o ciclo do enxofre ou carbono. Isto poderá ser feito na forma de grupo de discussão quando do encontro no centro de estudos.

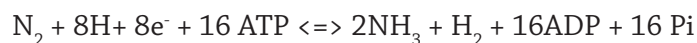
CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos mais importantes componentes de ciclos biogeoquímicos. Em seres vivos está presente como constituinte dos aminoácidos e proteínas e ácidos nucleicos. Na atmosfera é o componente gasoso mais abundante sendo também encontrado no solo e nos oceanos. Apesar da grande quantidade presente no planeta, a disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores limitantes no desenvolvimento vegetal e animal. Plantas não podem assimilar diretamente o nitrogênio atmosférico gasoso e necessitam de nitrogênio na forma de amônia ou nitrato para o seu desenvolvimento. Animais por outro lado obtêm nitrogênio através do consumo de compostos nitrogenados de outros organismos. Portanto a disponibilidade de nitrogênio na maioria dos ecossistemas está na dependência de matéria orgânica viva e morta. Este estoque de nitrogênio reentra os ciclos biogeoquímicos pela decomposição de matéria orgânica através de microrganismos decompositores do solo como bactérias, actinomicetos e fungos. Estes organismos convertem a amônia (NH_3) a sais amoniacais solúveis (NH_4^+). Amônio pode ser adsorvido em partículas do solo formando colóides que podem ser liberados e convertidos a nitrito

(NO₂⁻) por bactérias do gênero *Nitrosomonas*. Bactérias *Nitrobacter* podem utilizar nitrito e convertê-lo a nitrato (NO₃⁻). O processo de oxidação da amônia a nitrato é conhecido como nitrificação. Nitrato é extremamente solúvel e é facilmente carregado pelo fluxo de água até os cursos d'água e o oceano. Nestes ambientes, e em solos anaeróbios, o nitrato é denitrificado por bactérias heterotróficas e liberado na atmosfera. Apesar de nitrogênio atmosférico poder ser incorporado ao solo pelas chuvas ou raios, a maior parte do nitrogênio disponível para o crescimento de organismos é incorporada a partir da atividade de bactérias, actinomicetos e cianobactérias. Descreveremos em mais detalhes alguns destes processos mediados por microrganismos.

Fixação biológica de nitrogênio

Em termos gerais o processo de fixação de nitrogênio pode ser sumarizado na seguinte equação:



Esta equação é realizada apenas por procariotos e necessita da enzima nitrogenase. A nitrogenase é uma enzima extremamente bem conservada entre organismos que fixam nitrogênio atmosférico e é constituída por duas subunidades protéicas, uma complexada ao íon ferro e a outra ao íon molibdênio. As reações ocorrem quando o N₂ atmosférico se liga à nitrogenase e a subunidade férrica da enzima é reduzida por elétrons doados de uma molécula de ferredoxina. A subunidade férrica da nitrogenase agora liga uma molécula de ATP e reduz a porção molibdênica da enzima doando elétrons para a molécula de nitrogênio produzindo HN=NH. Dois novos ciclos de redução levaram esta molécula HN=NH até H₂N-NH₂, que por sua vez será reduzida a 2NH₃. A nitrogenase pode ser encontrada em organismos de vida livre ou simbióticos. Entre os de vida livre encontramos organismos aeróbicos (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella* e *Cyanobacteria*) e anaeróbios (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, bactérias púrpuras e verdes redutoras ou não de enxofre). Entre as simbiotes temos as consorciadas a leguminosas (*Rhizobium*) e outras plantas (*Frankia* e *Azospirillum*).

O processo de associação do *Rhizobium* e leguminosas é de grande interesse agrônomico e muitos estudos se preocupam com a sua elucidação. O processo de nodulação se inicia com a migração ativa de bactérias *Rhizobium* do solo para a rizosfera de uma leguminosa suscetível. Esta migração se dá pelo reconhecimento por parte da bactéria de exudatos produzidos pela planta. Deste reconhecimento resulta a adesão de células de *Rhizobium* aos pêlos radiculares da leguminosa. Flavonóides presentes no exudato da planta induzem a expressão de genes Nod da bactéria que produzira fatores de nodulação, os quais

induziram o pêlo radicular a se curvar (Figura 16). Como resultado deste curvamento forma-se (a partir do metabolismo vegetal) um canal de infecção, por onde as bactérias se dividem e crescem em direção ao córtex da raiz (Figura 16). Os fatores de nodulação continuam sendo produzidos, induzindo a constante divisão celular das células da raiz e resultando na formação de um nódulo. Neste nódulo, inúmeras bactérias são encontradas e a maior parte delas apresenta formas aberrantes, os bacterioides. Estes bacterioides são envoltos pela membrana plasmática da planta e nestes locais a nitrogenase intracelular do bacterióide se torna ativa. A reação de fixação de nitrogênio só ocorre na ausência de oxigênio. Para a manutenção de condições anaeróbicas a planta produz uma proteína, a leghemoglobina que de maneira similar à hemoglobina liga O_2 atmosférico e mantém a atividade da nitrogenase.

Como visto o processo de fixação de nitrogênio por *Rhizobium* é um processo complexo e que necessita de diversos fatores, tanto vegetais como bacterianos para o seu estabelecimento.

Nitrificação

O processo de nitrificação é a oxidação da amônia até nitrato e é feita por bactérias quimioautotróficas, que aproveitam a energia gerada no processo de conversão da amônia para produzir compostos orgânicos a partir do CO_2 atmosférico. Geralmente os processos de nitrificação acontecem consorciados, ou seja, bactérias que oxidam amônia a nitrito normalmente são encontradas no mesmo ambiente com bactérias que convertem nitrito a nitrato. Esta associação possui conseqüências ambientais importantes. Em solos sadios a taxa de nitrificação é extremamente alta e resulta na conversão quase total da amônia a nitrato. Plantas podem assimilar tanto amônia como nitrato, entretanto amônia, por ser carregada positivamente, tende a adsorver as partículas do solo, enquanto o nitrato é facilmente carregado pelo fluxo d'água, resultando em diminuição da quantidade total assimilável no solo. Como bactérias *Nitrossomonas*, que convertem amônia a nitrito, são inibidas por concentrações crescentes de nitrito e *Nitrobacter* converte nitrito a nitrato, os níveis de nitrito se mantêm baixos e garantem o desenvolvimento de *Nitrossomonas*, que por sua vez garantem o suprimento de nitrito para as *Nitrobacter*. Como nitrato decai no solo com rapidez, a atividade da *Nitrobacter* é constante e daí a alta conversão de amônia a nitrato.

Denitrificação

Denitrificação é o processo pelo qual nitrato é convertido até óxido nítrico, nitroso ou N_2 e liberado na atmosfera. Este processo é realizado por bactérias anaeróbicas através da respiração anaeróbica. Neste

processo o nitrato é utilizado como aceptor de elétrons na cadeia respiratória ao invés do O₂. Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Alkaligenes* e *Bacillus* são responsáveis por esta conversão e os totais de denitrificação são próximos aos observados nos processos de fixação, resultando em um balanço de nitrogênio próximo do neutro.

Como visto através da interação destes diversos ciclos biológicos, ocorre a ciclagem de matéria mineral no planeta. Modificações nestes processos, como a adubação nitrogenada na agricultura ou criação pecuária extensa, podem modificar os totais de nitrogênio disponível e portanto resultar em modificações nestes processos biogeoquímicos.

Isolamento de *Rhizobium* de nódulos de feijão

A partir de plantas de feijão previamente inoculadas com *Rhizobium*, retire cuidadosamente a porção radicular do feijão e proceda à assepsia do material em banho de álcool 70% por 2 min e hipoclorito de sódio 2% por 15 min. Após, enxágüe em água destilada estéril e macere o nódulo em solução fisiológica estéril. Note a coloração do macerado. Transfira 100 µl da solução para meio de cultura manitol extrato de levedura (Anexo 4) e incube por 72 h à temperatura ambiente.

AUTO-AVALIAÇÃO

Por favor responda as seguintes questões:

Questão 1:

Qual a morfologia da colônia? Retire uma alçada da colônia e proceda à coloração de Gram. Como certificar-se de que a bactéria isolada é mesmo *Rhizobium*?

Questão 2:

Discuta com os seus colegas os ciclos biogeoquímicos do enxofre e do carbono. Como a atividade humana pode alterar estes ciclos e modificar as taxas de conversão destes compostos?

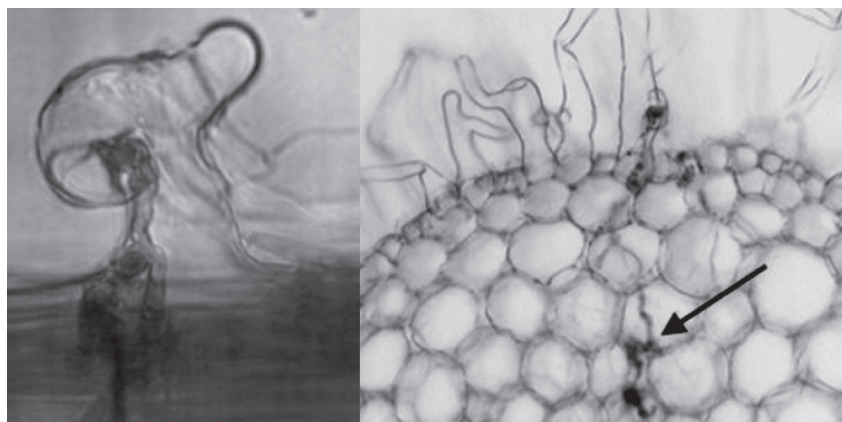


FIGURA 16 (da esquerda para direita): Infecção de células de *Rhizobium* em raiz de leguminosas. a) Note o dobramento do pêlo radicular da planta e multiplicação das bactérias em seu interior (células azuis). b) Formação do canal de infecção por onde as bactérias cresceram e atingiram o córtex da raiz (seta)

Microbiologia e o Homem

INTRODUÇÃO

Os microrganismos e o homem interagem constantemente e das mais variadas formas. Desta interação resultam processos patogênicos, sendo o homem hospedeiro de diversas bactérias, fungos e vírus, como relações mutualísticas, como a da microbiota intestinal e os processos de homeostase do homem. O homem também utiliza os microrganismos nos mais diversos processos industriais e agrícolas, como fonte de alimento e de biorremediação. Neste capítulo descreveremos um processo patogênico entre o homem e um vírus, um processo de mutualismo entre as bactérias probióticas e o processo digestivo. Evidentemente estes exemplos são apenas ilustrativos e didáticos. O aluno entretanto deve procurar outros exemplos e compartilhá-los com os colegas nos grupos de discussão. Na página do curso diversos temas ilustrativos da interação entre o homem e os microrganismos estão citados. Escolha um, e apresente um resumo para os seus colegas.

HIV

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e de sua interação com o hospedeiro não raramente efeitos deletérios são observados. Uma virose extremamente importante e que vem sendo estudada com atenção é a interação entre o vírus da imunodeficiência adquirida humana e o homem. Este vírus infecta células do sistema de defesa do homem, gerando uma diminuição na capacidade do hospedeiro em responder a infecções.

Histórico

Em 1978 homens homossexuais nos EUA e Suécia desenvolveram uma doença debilitante do sistema imune, que hoje é chamada de AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida). Na mesma época

homens heterossexuais apresentaram sinais similares na Tanzânia e Haiti. No ano de 1980 o número de mortes por AIDS foi estimado em 31 casos. Já em 1981, 234 casos foram reportados. O Centro para Controle de Doenças de Atlanta nos EUA reporta nesta época um aumento de morbidade de doenças pouco comuns entre homossexuais e alerta para uma nova doença que em 1982 foi ligada à transmissão de um agente infeccioso pelo sangue. O CDC utiliza o termo AIDS pela primeira vez e o número de casos fatais reportados é de 853. Em 1983 um laboratório francês e em 1984 um laboratório americano isolam um vírus do sangue de pacientes com AIDS e o denominam HIV. Com o isolamento do vírus em 1985, o primeiro teste sorológico para a detecção do vírus é comercializado. O número de mortes pela doença já é de 5.636 e, dentre estes, diversos artistas e celebridades, o que aumenta a preocupação da doença entre o público em geral. Em 1987 o AZT, a primeira droga antiviral para o tratamento da AIDS, é disponibilizado. Em 1990 o número de mortes nos EUA por AIDS é de 18.447. Até o ano 2000 apenas nos EUA é de meio milhão de pessoas. A AIDS é uma das doenças da era moderna melhor documentadas quanto à sua epidemiologia. Acredita-se que em 2005 existiam 40,9 milhões de pessoas no mundo infectados com o vírus e que 3,1 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença em 2005.

Ciclo da Doença

O vírus HIV possui pouca estabilidade no ambiente, sendo inativado facilmente fora do organismo. Entretanto em líquidos corpóreos como sangue e sêmen o vírus pode se manter por grandes períodos de tempo. Por este motivo, as formas de infecção do vírus são através do contato sexual desprotegido, compartilhamento de seringas e material sanguíneo. A transmissão do vírus entre mães e feto também é possível. Uma vez no corpo do hospedeiro, o vírus preferencialmente infecta linfócitos que possuem o receptor CD4. Muitas das drogas antivirais utilizadas no tratamento da AIDS procuram impedir a ligação efetiva da partícula viral e o receptor CD4. Uma vez a ligação ocorrendo, o vírus entra na célula hospedeira após a fusão de seu envelope com a membrana plasmática. O material genético do vírus é uma fita de RNA que através da enzima transcriptase reversa viral é transcrita em uma molécula de DNA. Algumas drogas que, como o AZT, inibem a ação da transcriptase reversa são utilizadas no controle da doença. A molécula de DNA viral entra no núcleo do linfócito CD4 e se integra no DNA do hospedeiro. Uma vez integrado, o DNA viral pode se manter latente no hospedeiro por muitos anos. A ativação da replicação viral leva à produção de RNAm e transcrição do material protéico viral, que resultará na montagem do vírus que é liberado por brotamento para infectar outras células. Como este

vírus infecta uma célula chave no sistema imune do hospedeiro, o infectado perde a capacidade plena de resistir a outras infecções e geralmente sucumbe de infecções oportunistas.

Perspectivas

A infecção pelo HIV é um exemplo do processo epidemiológico de desenvolvimento de doença. Em apenas 20 anos os casos da doença saltaram de unidades para milhões de infectados. A progressão de novas infecções vem diminuindo graças a programas de prevenção e tratamento, principalmente em países desenvolvidos e também no Brasil. Infelizmente a situação ainda é caótica em alguns países africanos.

PROBIÓTICOS

Alimentos probióticos são definidos pela FAO (Food and Agriculture Organization - ONU) como microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas resultam em efeitos benéficos para o hospedeiro. Geralmente os probióticos são bactérias e leveduras, sendo as bactérias do gênero *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* as mais empregadas, apesar de outros gêneros como *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* e a levedura *Saccharomyces* também serem utilizados como probióticos.

Efeitos dos probióticos

A população como um todo considera benéfico o consumo de alguns produtos fermentados, principalmente de origem láctea. Investigação científica criteriosa tende a concordar com estes efeitos. Os efeitos da ingestão de probióticos vão desde a melhoria nas condições de imunidade de idosos e imunocomprometidos até o controle de infecções. Como isso ocorre ainda é alvo de discussões, mas vários mecanismos de ação são propostos. Uma teoria atesta que a imensa comunidade microbiana encontrada nos seres humanos (na ordem de 10^{14} células, enquanto um indivíduo possui aproximadamente 10^{13} células) mantém-se em equilíbrio através de competição por espaço e nutrientes, impedindo o estabelecimento de outros microrganismos patogênicos. Microrganismos endosimbiontes são encontrados no trato digestivo, na pele, no sistema urogenital, etc. No sistema digestivo, microrganismos auxiliam no processo de digestão dos alimentos, principalmente da lactose em indivíduos lactose-intolerantes. Muitos microrganismos do trato digestivo também produzem vitaminas que são assimiladas pelo indivíduo e portanto resultam em melhoria no estado geral do indivíduo.

Produtos probióticos

Uma das fontes mais comuns de agentes probióticos são os produtos fermentados do leite como os iogurtes. Estes produtos possuem *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* que funcionam como probióticos. Vários suplementos alimentares são comercializados como agentes probióticos. Os mais conhecidos no Brasil são *L. casei* Shirota e *B. breve* linhagem Yakult, presente em leite fermentado.

O estudo da comunidade microbiana mutualista no organismo humano e animal é uma área de estudo em microbiologia extremamente promissora. Pesquise e apresente para seus colegas exemplos de probióticos e seus efeitos.

AUTO-AVALIAÇÃO

Por favor responda as seguintes questões:

Questão 1:

Por que o número de casos da AIDS cresceu exponencialmente e hoje em alguns países tende a diminuir? Você esperaria o mesmo para outras doenças?

Questão 2:

Quais pontos do ciclo de vida do vírus você usaria para o desenvolvimento de estratégias de controle dessa doença?

Normas para Trabalhos Práticos em Microbiologia

BIOSSEGURANÇA

1. Os alunos deverão adquirir e trazer para todas as aulas práticas: fósforo ou isqueiro (para uso do bico de Bunsen); caneta para retroprojektor (para identificação do material em uso); guarda-pó.
2. O uso do guarda-pó é OBRIGATÓRIO.
3. Observar RIGOROSAMENTE o horário da aula prática.
4. Manter sobre a área de trabalho apenas o material estritamente necessário para a realização da atividade prática (material supérfluo deve ser depositado nos escaninhos ao fundo da sala).
5. Manter o ambiente de trabalho calmo. Evitar deslocamentos desnecessários.
6. EM CASO DE ACIDENTE – COMUNICAR O OCORRIDO IMEDIATAMENTE AO PROFESSOR.
7. O material de trabalho deve ser mantido nos suportes adequados, e não abandonado sobre a bancada.
8. Ao acender o bico de gás, aproximar primeiro a chama ao bico, em seguida abrir a torneira. Ao fim do procedimento experimental, apagar imediatamente a chama.
9. As alças, agulhas e espátulas metálicas de repicagem devem ser flambadas antes e após a sua introdução nos tubos ou placas de cultura. Os tubos deverão ter as bocas flambadas após a retirada da rolha e antes de sua recolocação.
10. LER O ROTEIRO DE AULA PRÁTICA ANTES DE INICIAR O TRABALHO.

11. IDENTIFICAR TODO MATERIAL PRODUZIDO.
12. Lavar as mãos antes e após o procedimento experimental.
13. NUNCA LAVAR MATERIAL CONTAMINADO NAS PIAS DO LABORATÓRIO.
14. NÃO LEVAR NADA À BOCA NO LABORATÓRIO. É PROIBIDO COMER, BEBER, MAQUIAR-SE ETC.

Manual para a Confecção de Relatório

INTRODUÇÃO

O relatório é o principal veículo de comunicação entre o experimentador e seu público. É a maneira formal pela qual as atividades laboratoriais são descritas e analisadas. Geralmente os agentes que produzem os relatórios são alunos, técnicos ou profissionais contratados para fins específicos e os mesmos são lidos e analisados pelos respectivos professores, chefes e contratantes. Portanto, mais do que um simples relato o relatório é um documento de trabalho que certifica procedimentos e resultados. Como o relatório é normalmente o principal, se não o único, documento que veicula uma atividade com seu público alvo é de extrema importância que sua confecção receba especial atenção quanto à precisão, correção e concisão. Um relatório deve ser escrito de maneira clara e objetiva, evitando informações desnecessárias e supérfluas que poderão confundir o leitor. Deverá também ser escrito com todos os detalhes necessários para que o experimento possa ser compreendido, repetido e analisado pelo leitor. Para assegurar que o leitor possa compreender o experimento é necessário que uma introdução ao assunto seja incluída no relatório. Esta introdução deve descrever o “estado da arte” da área de interesse do relatório. Deve ser completo, porém sucinto, evitando informações que são de domínio comum, mas ao mesmo tempo fornecendo ao leitor os dados necessários para a compreensão do procedimento. Neste item é conveniente citar trabalhos publicados por outros autores que possam servir de referência para a análise. O procedimento em si deve ser descrito de maneira clara e que garanta a reprodutibilidade do ensaio. Procedimentos corriqueiros não devem ser descritos, mas citados, e quando necessário uma citação do descritor do procedimento deve ser feita. Os resultados devem ser reportados em forma de texto e figuras, tabelas e gráficos devem ser adicionados apenas quando complementarem e facilitarem a descrição dos resultados. Finalmente, o relatório deve conter uma discussão dos resultados

obtidos, que deve contemplar o confronto entre os dados gerados com os conhecidos na literatura. Para este fim existem diversos formatos de relatório, mas a grande maioria segue o modelo que descreveremos a seguir em mais detalhe.

TÍTULO

O título é o primeiro contato do leitor com o assunto a ser relatado. Deve situar o leitor quanto ao assunto e relevância do trabalho, o método utilizado, os principais resultados e as conclusões obtidas de maneira a seduzir o leitor à leitura. Entretanto, deve fazê-lo em apenas uma sentença, o que torna a redação de um bom título muito difícil. Por exemplo, a nossa primeira aula prática abordará a presença de microrganismos em todos os ambientes da terra. Para tanto, placas de Petri contendo meio de cultura serão expostas ao ar e após um período de incubação o crescimento de microrganismos será estimado pela contagem de colônias filamentosas e cremosas. Para enriquecer o experimento, dois meios de cultura diferentes e tempos de exposição diversos serão empregados. Um possível título para este relatório seria: “Exposição ao ar por 5 e 10 minutos de placas de Petri contendo os meios ágar-Sabouraud e ágar-simples e subsequente incubação das preparações a 25 e 37 °C por 7 dias seguidos da contagem do número de colônias filamentosas e cremosas visando demonstrar a presença de microrganismos neste ambiente.” Este título contempla todos os quesitos descritos anteriormente, mas infelizmente o faz de maneira prolixa. Um outro título mais conciso poderia ser: “Contagem de colônias cremosas e filamentosas formadas em meio de cultura Sabouraud e simples, após exposição do meio ao ar por 5 e 15 minutos.” Este título é mais conciso e contém quase todas as informações importantes para a compreensão do experimento, mas peca em não introduzir o leitor no objetivo do experimento. Um outro título poderia ser “Ubiquidade de microrganismos”. Este título é extremamente conciso, mas não informa o procedimento em si. Talvez um título mais adequado fosse: “Caracterização de fungos e bactérias do ar através de cultura em meios específicos”. Você tem outras idéias?

Introdução

A introdução fornece ao leitor os dados necessários para a compreensão do experimento e deve conter obrigatoriamente uma descrição do “estado da arte” da área abordada pelo trabalho. Deve indicar ao leitor o objetivo do trabalho, trabalhos relacionados já publicados e a importância e relevância do estudo. Deve referenciar os trabalhos importantes da área (vide normas ABNT para citação científica), para permitir que o leitor tenha acesso, caso necessário, a outras fontes de informação pertinentes. Novamente a descrição deve ser concisa e precisa. O objetivo do trabalho deve ser explicitado na introdução.

Material e métodos

O item “Material e métodos” deve descrever todo o procedimento utilizado visando permitir que o leitor seja capaz de compreender e reproduzir o experimento. Novamente a concisão é primordial. Para que ela seja alcançada, procedimentos corriqueiros e de domínio do público alvo devem ser evitados. Para um público de microbiologistas não existe a necessidade de se descrever as técnicas de assepsia e esterilidade, pois estas são corriqueiras a todos os microbiologistas. Entretanto, se o objetivo do experimento for testar estas técnicas, a descrição é essencial. Técnicas complexas, de conhecimento geral, devem ser referenciadas e não descritas. Assim, se você fizer uso de um gel de eletroforese, não existe a necessidade de descrever todo o procedimento, mas apenas o tipo de gel, concentração, etc., e referendar o leitor à descrição do método por Lamelli, 1970. Isto permite ao leitor ter acesso à técnica, conhecer os ajustes feitos pelo experimentador para a obtenção dos resultados e garante a reprodutibilidade do procedimento. Quando necessário o item “Material e métodos” pode conter figuras, gráficos e tabelas, mas de maneira alguma estes recursos podem substituir a descrição do procedimento em forma de texto. As figuras, gráficos e tabelas devem ser citadas no texto, como o descrito nas normas da ABNT.

Resultados

Este item deve descrever os resultados obtidos. A descrição deve ser feita de maneira concisa e direta. Apenas o observado deve ser relatado. Os dados não devem ser discutidos neste item, apenas citados. A análise estatística dos resultados numéricos é obrigatória. Os resultados devem sempre ser descritos em forma de texto. Caso a observação gráfica ou tabular dos resultados numéricos permita uma melhor compreensão dos resultados, gráficos e tabelas podem ser anexados após a descrição em texto do dado e citação da ilustração. No caso de descrições morfológicas, o observado deve ser descrito em texto e, caso necessário, uma figura do observado pode ser anexada, após a descrição no texto e citação. Figuras, tabelas e gráficos são ilustrações do procedimento/resultado. Devem ser anexadas ao texto somente quando inequivocamente acrescentem ao leitor uma melhor compreensão dos resultados. Ilustrações não são objetos de decoração. Elas devem ser claras e precisas. Toda ilustração deve ser numerada sequencialmente e anexada ao texto em local adjacente a sua citação no texto também sequencialmente. Toda ilustração deve conter uma legenda que permita ao leitor, após a leitura, compreender a ilustração sem a necessidade de recorrer ao texto. Fotos, desenhos e outros recursos gráficos devem conter uma barra representando a escala do observado, permitindo ao leitor estimar o tamanho do objeto. O aumento das objetivas do microscópio não demonstra o tamanho do objeto, pois, durante a reprodução, novamente o tamanho do objeto é modificado pela ampliação da foto/desenho, portanto nunca indique o aumento do microscópio.

Discussão

Neste item o observado no resultado deve ser confrontado com o descrito na literatura (sabiamente citado pelo autor na introdução) e as divergências e congruências entre os dados analisados criticamente. O autor deve, à luz do procedimento experimental, confrontar o seu objetivo inicial com os resultados obtidos e propor explicações para o observado. Na discussão, a adequação do procedimento, e as suas implicações na exatidão dos resultados deve ser analisado criticamente pelo autor e sugestões de modificações metodológicas devem ser sugeridas.

Referências Bibliográficas – Use as normas ABNT.

As citações são elementos (partes, frases, parágrafos, etc.) retirados dos documentos pesquisados durante a leitura da documentação e que se revelam úteis para sustentar o que se afirma pelo autor no decorrer do seu raciocínio. Ex.: (Severino, 1992, p. 85). “As citações bibliográficas devem ser: exatas, precisas, e averiguáveis por todos. Através delas é possível identificar e localizar a fonte.” Elas podem aparecer no texto (autor, ano, páginas) ou em notas de rodapé.

Tipos de citação

Citações formais ou diretas ou transcrição: quando transcrevem literalmente trechos de obras. Devem aparecer entre aspas, respeitando pontuação e ortografia. São apresentadas em forma de referências bibliográficas, acompanhadas de indicações exatas dos documentos de onde foram recolhidas, uma vez que “a virtude fundamental do citador é a fidelidade” (Salvador, 1978, p. 206).

Citações conceptuais ou indiretas ou paráfrase; citação livre do texto: quando sínteses pessoais reproduzem fielmente as idéias de outros autores. Não é necessário indicar a página, simplesmente o sobrenome do autor e a data de publicação do trabalho.

Ex.: conforme Fontes (1987).

Em caso de citação de dois ou mais trabalhos do mesmo autor com o mesmo ano de publicação, diferenciar cada um utilizando letras minúsculas junto à data.

Ex.: Souza, 1978

Souza, 1978a

Citação de citação: quando for absolutamente indispensável a menção a um trabalho ao qual o autor não teve acesso, mas do qual tomou conhecimento apenas por estar citado em outra publicação. Para simplificar a forma de apresentação é necessário o emprego da expressão latina “Apud” no texto. Ex.: Silva (1978) Apud Souza (1985).

- No texto:

BRADLEY Apud ARMITAGE (1991)

- Na bibliografia:

ARMITAGE, W. J. Supply of corneab issue in the United Kingdom Br. Journal Ophitalmology, v. 74, p. 650-3, 1991.

As citações devem se ater ao essencial:

a) Elipse ou supressões: é permitida a omissão de palavras na citação quando seu sentido não é alterado. Tal omissão é indicada por reticências entre parênteses (...). Quando são omitidos um ou diversos parágrafos, deve-se usar uma linha pontilhada. Assim:

b) Interpolação ou comentários: a exatidão é fundamental na citação. Portanto, qualquer correção ou observação feita deve ser indicada corretamente. Corrige-se da seguinte forma:

- inserindo a expressão "sic" entre colchetes ou parênteses: (sic), [sic];
- inserindo a correção entre colchetes ou parênteses: [...];
- inserindo frases indicando a correção, entre colchetes ou parênteses. Quando for utilizado o grifo (negrito, itálico, etc.), isto deve ser mencionado: (grifo do autor) ou (grifo meu);
- é indispensável mencionar os dados necessários à identificação da fonte da citação. Estes dados devem aparecer no texto e listas no fim de texto.

Observações:

- Qualquer obra utilizada, citada ou não no texto, deverá aparecer na bibliografia final.
- A chamada ou entrada usada no texto deve ser a mesma na bibliografia.

Definição

Conjunto de indicações precisas e minuciosas, retiradas do próprio documento, permitindo sua identificação no todo ou em parte. Os elementos de referência bibliográfica de documentos (livros, textos, periódicos, anais de congressos, folhetos, etc.) considerados no todo ou em parte devem ser retirados sempre que for possível da folha de rosto da obra consultada. Dividem-se em essenciais e complementares.

Elementos

Essenciais: são informações indispensáveis à identificação do documento. Estão estritamente ligados ao suporte documental e variam, portanto, conforme o tipo de documento. Ex.: autor, título, local, editora, data de publicação, página inicial e final (quando se tratar de capítulos ou partes de um documento).

Complementares: são informações que, acrescentadas aos elementos essenciais, permitem melhor caracterizar o documento. Ex.: edição, editor, páginas, porte físico, ilustrações, dimensões, série. Todos estes elementos juntos permitem caracterizar, localizar e datar publicações referenciadas em bibliografias, resumos e/ou resenhas.

Localização

A referência bibliográfica pode aparecer no fim de texto ou de capítulo.

Organização

As referências bibliográficas são organizadas em ordem alfabética por sobrenomes de autores, títulos ou assuntos, sempre observando a entrada que foi dada no texto.

Pontuação

Deve ser uniforme para todas as referências.

- a) Os vários elementos da referência bibliográfica (nome do autor, título da obra, edição, notas tipográficas – imprensa – , notas bibliográficas e notas especiais) devem ser separados, entre si, por ponto seguido de dois espaços.

Ex.: SILVA, João da. A história da moeda. 3. ed.

- b) Os elementos das notas tipográficas (local, editor, data) e bibliográficas devem ser separados, entre si, por dois pontos. Datas são separadas por vírgula.

Ex.: São Paulo, Atlas, 1986

- c) A nota de série e/ou coleção é, por tradição, apresentada entre parênteses, indicando-se os títulos e sua numeração.

Ex.: (Série os historiadores)

(Os economistas)

(Texto para discussão, 31)

- d) Ligam-se por hífen as páginas inicial e final das partes referenciadas, bem como as datas-limite de determinado período da publicação.

Ex.: p. 55-68

- e) Ligam-se por barra transversal as datas-limite do período a que se refere a publicação referenciada.

Ex.: 1976/1989

Tipos ou fonte (estilo de letra)

Empregam-se maiúsculas (tipo caixa alta) nos sobrenomes dos autores individuais, nos nomes de entidades coletivas, nos títulos de periódicos e na primeira palavra do título quando constituírem a entrada da referência.

Elementos de referência bibliográfica

Autorias:

- a) Autor pessoal: responsável pela criação, conteúdo intelectual ou artístico de um documento. Inicia-se a entrada pelo último sobrenome do autor, em letras maiúsculas, seguido pelo(s) nome(s). Emprega-se vírgula entre o sobrenome e o(s) nome(s). Os nomes são transcritos como aparecem nos documentos.

Ex.: SILVA, L

TEIXEIRA, J. S.

- b) Sobrenomes ligados por hífen

Ex.: DUQUE-ESTRADA, O.

- c) Sobrenomes que indicam parentesco

Ex.: ARARIPE JÚNIOR, I. A.

FERRARI FILHO, H.

- d) Sobrenomes compostos de um adjetivo mais um substantivo.

Ex.: CASTELO BRANCO, C.

ESPÍRITO SANTO, H.

SANTA CRUZ, A.

- e) Sobrenomes cuja forma composta é a mais conhecida

Ex.: EÇA DE QUEIROZ, J. M.

MACHADO DE ASSIS, A. M.

- f) Sobrenomes espanhóis:

Ex.: GARCÍA MÁRQUEZ, G.

RODRIGUEZ LARA, J.

- g) Documentos elaborados por um autor, dois autores, três autores, mais de três autores

Ex.: HUNT, L.

HUNT, L.; HUBBERMAN, J.

HUNT, L.; HUBBERMAN, J.; SILVA, M.

Entrada coletiva

Autor, entidade, instituição(ões), organização(ões), empresa(s), comitê(s), entre outros, responsável(eis) por publicação em que não se distingue autoria pessoal. Trabalhos de cunho administrativo ou legal. Ex.:

No texto:

(FUNDAÇÃO, 1982, p. 57)

Na bibliografia:

FUNDAÇÃO DE ECONOMIA E ESTATÍSTICA. Agricultura no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: 1982 (25 Anos da Economia Gaúcha, v. 3)

Quando a entidade coletiva é hierarquicamente vinculada aos governos federal (Ministério), estadual e municipal (Secretarias), conselhos e universidades:

No texto:

BRASIL (1995, p. 125)

RIO GRANDE DO SUL (1996, p. 101)

PORTO ALEGRE (1997, p. 27)

CONSELHO (1987, p. 5)

UNIVERSIDADE (1985, p. 30)

Na bibliografia:

BRASIL. Ministério da Educação e Cultura. A educação no Brasil ano 2000. Brasília: 1995. 223 p.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura. Agricultura em números. Porto Alegre: 1995. 193 p.

PORTO ALEGRE. Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Departamento Municipal de Águas e Esgotos. Relatório anual. Porto Alegre: 1997. 190 p.

CONSELHO FEDERAL DE EDUCAÇÃO. Currículos mínimos de cursos de graduação. 8 ed. rev. atual. Brasília: 1987. 498 p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Estatuto, regimento geral. Porto Alegre: 1985. 74 p.

Trabalho apresentado em eventos (congressos, encontros, simpósios, etc.):

MALDONADO FILHO, E. A transformação de valores em preço de produção e o fenômeno da absorção e liberação de capital produtivo. In: ENCONTRO NACIONAL DE ECONOMIA, 15. Salvador: ANPEC, 1-4, dez. 1975. *Anais...* p. 157-75.

Evento no todo:

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE REDES DE COMPUTADORES, 13. 1995. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG, 1995. 655 p.

Eventos em meio eletrônico, no todo ou em parte:

CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPel, 4. 1995. Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPel, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpel.br/anais/anais.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10. 1998. Fortaleza. *Anais...* Tec Tralha, 1999. 1 CD.

Publicações anônimas ou não assinadas: entrar diretamente pelo título, sendo a primeira palavra em maiúscula.

ANTOLOGIA Latina. 6. ed. Madrid: Credos, 1968. 291 p.

Coletânea de textos:

Autor, coordenador, editor diferentes da parte referenciada:

BACHA, L. Hierarquia e remuneração gerencial. In: TOLIPAN, R.; TINELLI, A. C. A. Controvérsia sobre Distribuição de Renda e Desenvolvimento. Rio de Janeiro: Zahar: 1975. p. 124-55 (Biblioteca de Ciências Sociais)

BERTOLA, G.; CAVALLERO, R. Sustainable intervention polices and exchange rate dynamics. In: KRUGMAN, P.; MILLER, M. (Ed.) Exchange Rate Target and Currency Banks. Cambridge: University Cambridge, 1992.

Autor, coordenador, editor igual ao autor da parte referenciada:

GAROFALO, L.; CARVALHO, C. Teoria Microeconômica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1986. Cap. 4. Os modelos de formação de preços. p.338-59.

Técnicas de Assepsia

Assepsia é a diminuição do número de microrganismos presentes em uma área ou material. Diversas técnicas podem ser utilizadas para este fim, sendo o enxágüe da área a ser limpa com álcool 70% a mais comum. Mãos e áreas cirúrgicas podem ser limpas com uma solução de álcool-iodado após o expurgo por lavagem com sabão ou solução antisséptica.

Esterilidade é a total eliminação de qualquer microrganismo de uma região ou material. Isto pode ser feito de várias maneiras, mas em condições de laboratório normalmente é obtido através da passagem do material pela chama ou autoclavagem.

Discutiremos as principais técnicas de assepsia e esterilidade a serem utilizadas na realização das aulas práticas a seguir:

Como vocês observarão na primeira prática, diversos microrganismos são encontrados no ar e por conseguinte na superfície de bancadas e materiais. Para evitar a contaminação por estes organismos no material laboratorial recomenda-se:

- a) Assepsia da bancada de trabalho: Isto pode ser feito pelo enxágüe da bancada com uma solução de álcool 70%. Cuidado especial deve ser tomado para o manuseio desta solução devido a suas características inflamáveis.
- b) Esterilização do ar em volta da área de trabalho. O ato de abrir placas ou meios de cultura resulta na exposição destes materiais ao ar e conseguinte contaminação. Para evitar tal problema recomenda-se que qualquer material estéril ou que se deseja evitar a contaminação seja aberto próximo a uma chama acesa. Numa área de duas vezes a altura da chama e uma vez o seu raio, todo ar presente após certo período terá passado pela chama. Isto se dá pelo deslocamento do ar aquecido em volta da chama, que deixará espaço para o ar frio. Isto resultará numa ciclagem do ar em volta da chama, evitando que material suspenso no ar caia na bancada ou material antes de ter passado pela chama. A simples passagem pela chama é suficiente para resultar em

esterilização do ar. Tubos e placas que serão abertos devem ter a sua boca flambada (exposição à chama) imediatamente após serem abertos ou antes de serem fechados, para evitar a contaminação com material não estéril em sua superfície.

- c) Esterilização de instrumental microbiológico. Alças que transportaram inóculo correto devem ser flambadas até que a ponta se torne vermelha. Este procedimento, além de garantir a esterilidade, permite que todo material orgânico presente na alça seja calcinado e não modifique a composição dos meios de cultura utilizados. Após o aquecimento da ponta da alça até o rubro, o resto da alça (que entrará em contato com o material) deve ser passado rapidamente pela chama para esterilização. Todo material deve ser flambado após a realização do procedimento para evitar contaminação quando de outro procedimento.
- d) Esterilização de meios e soluções. Quando possível a autoclavação é o procedimento a ser utilizado. A autoclave funciona a partir do vapor d'água que saturando um reservatório resulta em uma temperatura de 121 °C. Como o vapor d'água é um ótimo transmissor de calor e permeia todos os materiais presentes no interior da autoclave, a exposição do material a estas condições por 15 a 20 min resulta na total inviabilização de todo material biológico presente no interior da campânula da autoclave.

Meios de Cultura

Meios de cultura são soluções ou substratos sólidos contendo nutrientes, osmolaridade e pH adequados para o desenvolvimento de microrganismos de interesse. Ao longo do curso utilizaremos os seguintes meios de cultura:

MEIO TSA – (TRYPTIC SOY AGAR)

Meio para o isolamento de bactérias do solo composto por:

Peptona de soja 15 g/l

Cloreto de sódio 5 g/l

Ágar 15 g/l

MEIO SABOURAUD

Meio para isolamento de fungos:

Peptona 1,0 g

Extrato de Levedura 0,5 g

Glicose 2,0 g

Ágar 1,5 g

Água destilada 100 ml

pH 6,5

MEIO BDA (BATATA DEXTROSE ÁGAR)

Meio geral para fungos:

300 g de filtrado de água de batata (Batatas cozidas até macias)

20 g de glicose

15 g de ágar

MEIO MÍNIMO

Meio geral para bactérias:

Peptona 1,0 g

NaCl 0,5 g

Extrato de Carne 0,3 g

Ágar 1,5 g

Água destilada 100 ml

pH 7,2-7,4

MEIO MANITOL EXTRATO DE LEVEDURA

Isolamento de *Rhizobium*:

manitol, 10 g

K₂HPO₄, 0,05 g

MgSO₄, 0,02 g

NaCl, 0,01 g

extrato de levedura, 0,5 g

ágar, 15 g

pH ajustado em 6,8

Testes Bioquímicos

Teste	Meio	Aspecto do meio	Resultado
Oxidase	Solução de Tetrametil-p-phenylenediamina (1%)	----	Adicionar uma gota da solução ao topo da colônia e caso a solução torne-se azulada-arroxeadada em 20 s o resultado é positivo. Não leia a reação após 30 s.
Catalase	Peróxido de Hidrogênio 3%	----	Adicionar gotas de peróxido de hidrogênio e observar a formação de bolhas
Nitrato	Caldo Simples:100 ml Nitrato de Potássio: 0.1 g pH 7,6	Meio Líquido Incolor	Adicionar gotas dos reagentes A (ácido sulfanílico) e B (Naftilamina). Caso o meio torne-se vermelho, o teste é positivo.
Fenilalanina	Extrato de levedura: 3 g DL-fenilalanina: 2 g Na ₂ PO ₄ : 1 g NaCl 5 g Ágar 12 g Água dest. para 1 l	Meio sólido inclinado e incolor	Adicionar gotas de cloreto férrico sobre a colônia. Caso as colônias tornem-se verdes o teste é positivo.
Uréia	Peptona: 1 g NaCl: 5 g KH ₂ PO ₄ : 2 g Glicose: 1g Vermelho de Fenol 2%: 6 ml Uréia: 10 g Água dest. para 1 l pH 6,9	Meio líquido amarelo	Caso o meio torne-se vermelho o teste é positivo

continua

Teste	Meio	Aspecto do meio	Resultado
Lactose Glicose Manitol	Água peptonada: 100 ml Indicador de Andrade: 1 ml 1 g de Glicose ou Lactose ou Manitol	Meios líquidos, ligeiramente róseos	Caso o meio torne-se vermelho o teste é positivo. Observe a formação ou não de gás no tubo de Durhan no interior do tubo de glicose.
Lisina Descarboxi-lase	O teste é composto por 2 tubos, o controle sem a adição de lisina e o teste com a adição de 0,5% lisina em um meio líquido base composto por: Peptona: 5 g Extrato de Levedura: 3 g Glicose: 1 g Vermelho de Bromocresol: 1 ml Água Dest. para 1 l pH 6,7-6,8 Camada superior de óleo mineral.	Tubos de coloração roxa com uma camada superficial de óleo mineral	Os dois tubos amarelos indicam resposta negativa. Um tubo amarelo e o outro roxo indicam teste positivo. Os dois tubos roxos indicam teste inconclusivo.
Malonato	Extrato de Levedura: 1 g Sulfato de Amônio: 2 g K_2HPO_4 : 0,6 g KH_2PO_4 : 0,4 g NaCl: 2 g Malonato de Sódio: 3 g Glicose: 0,25 g Azul de Bromotimol: 0,025 g Água dest. para 1 l	Meio líquido esverdeado	Meio de coloração azulada indica resultado positivo.

continua

Teste	Meio	Aspecto do meio	Resultado
Meio SIM	Caseína: 20 g Peptona de carne: 6,1 g Sulfato de ferro e amônia: 0,2 g Tiosulfato de Sódio: 0,2 g Ágar: 3,5 g Água dest. para 1 l pH 7,3	Meio sólido não inclinado e transparente	Adicionar ao topo do meio o reativo de Erlich-Bohme (p-dimetil-aminobenzaldeído e persulfato de amônio). Caso a solução torne-se rósea o teste é positivo para Indol. Observe o crescimento em volta da picada. Crescimento difuso indica teste positivo para motilidade. Presença de precipitado negro no meio indica teste positivo para H ₂ S.
Citrato	NaCl: 5 g Sulfato de Magnésio: 0,2 g Fosfato de Amônio: 1 g Fosfato de Potássio: 1 g Citrato de Sódio: 5 g Azul de bromotimol: 0,08 g Ágar: 20 g Água dest. para 1 l pH 7,0	Meio sólido inclinado, esverdeado	Meio azulado indica resultado positivo.

Teste de Gram

TESTE DE GRAM

Retire com a alça de platina uma pequena quantidade do caldo de cultura, transfira-a para o centro de uma lâmina e com movimentos circulares espalhe o líquido até obter um esfregaço homogêneo.

Passa a lâmina sobre a chama do bico de Bunsen até o aparecimento de vapores. Retire a lâmina da chama, espere e repita a operação até que o líquido seque totalmente.

Cobrir o esfregaço fixado com uma solução de cristal violeta e acrescentar 2 a 3 gotas de bicarbonato de sódio. Incube por 2 min.

Lavar o esfregaço com água e cobri-lo com lugol por 2 min.

Lavar novamente com água e descorar com solução de acetona-éter por até 30 s.

Lavar o esfregaço com água e cobri-lo com solução de safranina por 2 min.

Lavar novamente, secar a lâmina e examinar ao microscópio.



Para obter mais
informações sobre
outros títulos da
EDITORA UFMG,
visite o site

www.editora.ufmg.br

A presente edição foi composta pela Editora UFMG, em caracteres Chaparral Pro e Optma Std, e impressa pela Editora O Lutador, em sistema offset, papel offset 90g (miolo) e cartão supremo 250g (capa), em agosto de 2006.



CENTRO DE APOIO
À EDUCAÇÃO A
DISTÂNCIA UFMG

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Secretaria de Ensino a Distância
Ministério da Educação

