

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Mestrado Profissional

Alexsandra Lucia Pereira Resende

**CRIAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MICRO-ORGANISMOS PARA ATENDER AS
AULAS PRÁTICAS DOS CURSOS DA ÁREA DA SAÚDE DA FACULDADE DE
MINAS DE BELO HORIZONTE**

Belo Horizonte
2021

Alexsandra Lucia Pereira Resende

**CRIAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MICRO-ORGANISMOS PARA ATENDER AS
AULAS PRÁTICAS DOS CURSOS DA ÁREA DA SAÚDE DA FACULDADE DE
MINAS DE BELO HORIZONTE**

Versão final

Projeto de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Coorientadores: Isabela de Almeida Neves e Luis Adan Flores Andrade

Belo Horizonte

2021

043 Resende, Alexandra Lucia Pereira.
Criação de uma biblioteca de micro-organismos para atender as aulas práticas dos cursos da área da saúde da Faculdade de Minas de Belo Horizonte [manuscrito] / Alexandra Lucia Pereira Resende. – 2021.

69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis. Coorientadores: Isabela de Almeida Neves; Luis Adan Flores Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Fungos. 3. Bactérias. 4. Aula prática. I. Reis, Jordana Grazziela Alves Coelho dos. II. Neves, Isabela de Almeida. III. Andrade, Luis Adan Flores. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALUNA: ALEXSANDRA LUCIA PEREIRA RESENDE

Nº matrícula: 2019753450

Curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada- NÍVEL MESTRADO

Data da defesa de dissertação: 30 de novembro de 2021.

Título: "CRIAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MICRORGANISMOS PARA ATENDER AS AULAS PRÁTICAS DOS CURSOS DA ÁREA DA SAÚDE DA FACULDADE DE MINAS DE BELO HORIZONTE",

A Dissertação foi submetida à apreciação da banca examinadora que emitiu parecer favorável.

Dra. Thalita Arantes

Aprovada:

Examinadora

Dra. Luciana Debortoli de Carvalho

Aprovada:

Examinadora

Profa. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis

Aprovada:

Orientadora

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/11/2021, às 13:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Professora do Magistério Superior**, em 30/11/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Debortoli de Carvalho, Usuário Externo**, em 01/12/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1116692** e o código CRC **A63B7694**.

RESUMO

Passados mais de 300 anos que Leeuwenhoek descreveu a existência dos micro-organismos, os conhecimentos acerca desses organismos avançaram significativamente. Conhecimentos sobre suas características morfológicas, genéticas e moleculares, relação de causalidade com muitas doenças e técnicas de cultivo, isolamento e preservação têm sido amplamente explorados pelos cientistas. O mundo microbiano foi reconhecido pelo ser humano como importante e estabeleceu-se como uma ciência. A ciência da Microbiologia alcançou inúmeras conquistas para a humanidade e um exemplo expressivo são as vacinas que controlam e em alguns casos erradicaram doenças muitas vezes fatais. Todo esse conhecimento e conquistas são resultados de inúmeras pesquisas, experimentos e trabalhos práticos desenvolvidos ao longo dos séculos por milhares de cientistas. Nesse contexto, ressalta-se a relevância das atividades práticas em Microbiologia para a formação de novos cientistas e conseqüentemente de recursos humanos. O conhecimento das características morfológicas, bioquímicas e moleculares dos micro-organismos tem papel fundamental na formação dos profissionais das diversas áreas da saúde. Sob esse viés, é essencial que as Universidades tenham um acervo microbiano diversificado e que aproxime o roteiro das aulas práticas à realidade a ser encontrada pelos alunos no mercado de trabalho. Logo, a criação e manutenção de uma biblioteca de micro-organismos é ferramenta indispensável no ensino superior. Entretanto, o laboratório de Microbiologia da FAMINAS-BH não possui uma biblioteca de micro-organismos e tal situação tem sido um fator limitante do conteúdo abordado nas aulas práticas, principalmente para as disciplinas de Microbiologia Clínica, Micologia e Virologia. Portanto, a criação da biblioteca de micro-organismos contribuirá significativamente para o ensino em Microbiologia em todos os cursos inseridos na área biológica e da saúde ministrado nesta faculdade. Além disso, um catálogo contendo imagens das características macroscópicas e microscópicas das colônias também será confeccionado no intuito de melhorar e facilitar o aprendizado.

Palavras-chave: Preservação de micro-organismos. Fungos. Bactérias. Vírus. Aulas práticas.

ABSTRACT

300 (three hundred) years have passed since Leeuwenhoek described the existence of the microorganisms and the knowledge about these organisms progressed significantly. Pieces of information about: their morphological, genetical, and molecular characteristics, causality relations with many diseases, and cultivation, isolation, and preservation techniques have been widely explored by scientists. The microbial world was recognized as relevant and established itself as a science. Microbiological science reached uncountable achievements for humanity, and a significant example are the vaccines that almost eradicated diseases that may be fatal. All that knowledge and accomplishments are a result of the uncountable researches, experiments, and practical works developed throughout the centuries by thousands of scientists. In that context, it stands out the relevance of the practical microbiology activities for the creation of new scientists and human resources. The knowledge of morphological, biochemical, molecular, and other characteristics of the microorganisms has a fundamental part in the formation of professions in diverse health topics. Under such bias, it is impressive that the universities have a diversified microbial collection and approximate the script of practical classes to the reality to be faced by the students on the work market. Therefore, the development and maintenance of a microbiological library is an indispensable resource in university education. The FAMINAS-BH microbiology laboratory does not have a biobank, and this situation has been a limiting factor of the content approached in practical classes, especially for the clinical microbiology, mycology, and virology subjects. The creation of the biological library will contribute significantly to the instruction of microbiology in all degrees and classes inserted in biology and health areas taught in this college. Furthermore, a catalog containing images of the macroscopical and microscopical characteristics of the colonies will be confectioned to improve and facilitate the learning process.

Keywords: Preservation of microorganisms. Bacteria. Fungi. Virus. Practical classes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Morfologia de uma célula leveduriforme	16
Figura 2: Características de uma hifa.....	16
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura dos conídios do fungo <i>Aspergillus niger</i> e esporângio do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	17
Figura 4: <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (morfologia filamentosa à esquerda e levedura à direita)	18
Figura 5: Técnica de microcultivo em lâmina	21
Figura 6: Morfologia e arranjo de células bacterianas	23
Figura 7: Diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	24
Figura 8: Etapas da técnica de coloração de Gram	25
Figura 9: <i>E. coli</i> corada pelo Gram	26
Figura 10: <i>S. pyogenes</i> corado pelo Gram	26
Figura 11: Morfologia de vírus não envelopado e envelopado	32
Figura 12: Vírus na forma cilíndrica (simetria helicoidal) e esférica (simetria icosaédrica).....	33
Figura 13: Morfologia de vírus de DNA e RNA que infectam humanos e comparação do tamanho viral e bacteriano.	33
Figura 14: Características das famílias ou gêneros que infectam vertebrados	34
Figura 15: Ciclo lítico e infecção por bacteriófago T4 e ciclo lítico e lisogênico infecção por bacteriófago λ	35
Figura 16: Cultivo de <i>fago</i> em meio sólido	36
Figura 17: Laboratório de Microbiologia da FAMINAS-BH	45
Figura 18: Placas de Petri contendo amostras bacterianas	49
Figura 19: Tubos de ensaio contendo amostras de leveduras e fungos filamentosos	49
Figura 20: Fluxograma do processo de congelamento comum e descongelamento	51
Figura 21: Fluxograma do método de repicagem contínua	54
Figura 22: Fluxograma do método de Castellani	55
Figura 23: Placas de Petri contendo as primeiras amostras bacterianas	59
Figura 24: Tubos de ensaio contendo as primeiras amostras de leveduras e fungos filamentosos	60

Figura 25: Amostra da bactéria <i>Streptococcus sp.</i> em incubação	61
Figura 26: Microtubos para congelamento	61
Figura 27: Microtubos com leveduras para congelamento	62
Figura 28: Placas de Petri e tubos contendo fungos filamentosos em incubação	62
Figura 29: Frascos contendo amostras de fungos filamentosos (método de Castellani)	63
Figura 30: Microtubos das amostras leveduriformes doadas pelo Instituto Hermes Pardini	64
Figura 31: QR Code do catálogo	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais diferenças entre fungos, bactérias e vírus	14
Quadro 2: As principais micoses de interesse médico e seus agentes etiológicos ...	18
Quadro 3: Meios de cultura utilizados no cultivo dos fungos filamentosos e leveduriformes	20
Quadro 4: Exames microscópicos para identificação fúngica	22
Quadro 5: Meios de cultura sintéticos utilizados no crescimento e isolamento bacteriano.....	27
Quadro 6: Técnicas de semeadura	29
Quadro 7: Materiais para montagem da biblioteca e catálogo de micro-organismos	45
Quadro 8: Catálogo das amostras de micro-organismos de interesse	47
Quadro 9: Catálogo da FAMINAS-BH	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA: Ágar batata dextrose

BHI: Caldo Infusão de cérebro-coração

CLED: Cystine lactose electrolyte deficient

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

RNA: Ácido Ribonucleico

mL: Mililitro

mm: milímetro

pH: Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Fungos	15
1.1.1 Técnicas de cultivo e isolamento fúngico	19
1.2 Bactérias	22
1.2.1 Técnicas de cultivo e isolamento bacteriano	26
1.3 Vírus	31
1.3.1 Técnicas de cultivo e isolamento de vírus	35
1.4 Biblioteca de micro-organismos	36
1.5 Ensino em microbiologia: conquistas e desafios	41
2 JUSTIFICATIVA.....	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Materiais.....	44
4.2 População microbiana atual e de interesse	46
4.3 Preservação de culturas: Congelamento comum, Repicagem contínua e Método de Castellani.....	50
4.4 Catálogo da FAMINAS-BH	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	68
7 PERSPECTIVAS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO I.....	73
ANEXO II.....	99

1. INTRODUÇÃO

O estudo da Microbiologia teve início a mais de 300 anos quando Anton Van Leeuwenhoek descobriu a existência dos micro-organismos enquanto observava amostras de água da chuva por meio de um pequeno microscópio desenvolvido por ele (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Passados quase cem anos da descoberta dos micro-organismos, o biólogo dinamarquês Otto Müller, que ampliou os estudos de Leeuwenhoek, organizou as bactérias em gêneros e espécies, de acordo com o método de classificação de Carolus Linnaeus, representando o início da classificação taxonômica dos micro-organismos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Segundo MADIGAN e colaboradores (2016), após a descoberta do mundo microbiano por Leeuwenhoek, os anos seguintes não foram de muitos progressos na área. Contudo, em meados do século XIX os trabalhos do cientista francês Louis Pasteur colocaram a Microbiologia em destaque. Pasteur, por meio de experimentos eficientes e comprovativos, derrubou a teoria da geração espontânea, introduziu indiretamente meios de esterilização que beneficiaram a pesquisa, a medicina e a indústria alimentícia (pasteurização) e descobriu que as leveduras eram responsáveis pela fermentação alcoólica. Além disso, Pasteur foi um dos pioneiros no desenvolvimento de vacinas e seus trabalhos também deram solidez aos estudos de Robert Koch (MADIGAN *et al.*, 2016).

Koch buscava demonstrar o protagonismo dos micro-organismos na causalidade das doenças, desta forma, por meio de etapas científicas próprias e conhecidas mundialmente como Postulados de Koch, ele conseguiu provar que a bactéria *Bacillus anthracis* era o agente etiológico do antraz, doença que acometia os rebanhos de gado e ovelhas na Europa. Ele também desenvolveu métodos de coloração, fixação, fotografia e cultivo de bactérias em meio sólido. Ele descobriu ainda o *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose e a bactéria *Vibrio Cholerae*, causadora da cólera (ENGELKIRK e DUBEN – ENGELKIRK, 2012).

Desta forma, o período de 1857 a 1914 é denominado como a Idade de Ouro da Microbiologia. As contribuições de Louis Pasteur, Robert Koch, Paul Ehrlich, que descobriu o primeiro agente antibacteriano, entre outros pesquisadores, levaram ao

estabelecimento da Microbiologia como uma ciência (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A ciência microbiológica estuda os organismos microscópicos, suas atividades biológicas, suas relações intraespecíficas, interespecíficas e com o meio ambiente. Tendemos a associá-los como maléficos devido à sua relação de causalidade com muitas patologias, no entanto, os micro-organismos são extremamente relevantes para a manutenção do equilíbrio entre os organismos vivos na cadeia alimentar, além de apresentarem inúmeras aplicações benéficas na indústria alimentícia, na síntese de produtos químicos (ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas, enzimas, álcoois), entre outros.

O grupo dos micro-organismos inclui as algas microscópicas, os protozoários, os fungos (leveduras e bolores), as bactérias e os vírus (REIS e SANTOS, 2016; KIMURA *et al.*, 2013).

O quadro abaixo apresenta as principais diferenças entre os fungos, bactérias e os vírus.

Quadro 1. Principais diferenças entre fungos, bactérias e vírus.

Características	Micro-organismos		
	Fungos	Bactérias	Vírus
Reino	<i>Fungi</i>	<i>Monera</i>	-
Célula	Unicelular ou pluricelular	Unicelular	Acelular
Classificação	Eucarioto	Procarioto	-
Parede celular	Quitina	Peptidoglicano	-
Reprodução	Sexuada e assexuada	Assexuada	Precisam da maquinaria do hospedeiro
Nutrição	Quimio-heterotróficos	Heterotróficos e autotróficos	-
Utilização de oxigênio	Aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos	Aeróbios, Anaeróbios estritos, anaeróbios não estritos e facultativos.	-

Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Desde o estabelecimento da Microbiologia como uma ciência, os estudos na área têm sido progressivos e muito relevantes. A compreensão sobre o mundo microbiano permitiu o desenvolvimento e aprimoramento de inúmeras técnicas de isolamento, cultivo e preservação dos micro-organismos (PASSADOR *et al.*, 2010).

No contexto educacional, o conhecimento das características morfológicas, bioquímicas e moleculares dos micro-organismos tem papel fundamental na formação dos profissionais das diversas áreas da saúde, (médicos, biomédicos, dentistas, farmacêuticos, biólogos, nutricionistas, entre outros).

Desta forma, é essencial que as Universidades tenham um acervo microbiano diversificado que aproxime o roteiro das aulas práticas à realidade a ser encontrada pelos alunos no mercado de trabalho. Levando em consideração a infinidade de aplicações comerciais, como por exemplo: a produção de vitaminas, imunobiológicos, enzimas, bebidas alcoólicas, queijo, iogurte, entre outros, além do grande número de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, leveduras e fungos filamentosos, é imprescindível que uma instituição de ensino disponha de um acervo microbiano muito abrangente. Logo, a criação e manutenção de uma biblioteca de micro-organismos é ferramenta indispensável nos cursos de graduação a níveis de bacharelado e licenciatura nas áreas biológicas e das ciências da saúde.

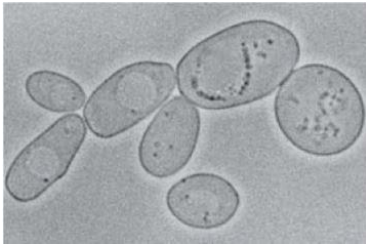
1.1 Fungos

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no ar, no solo, na água, entre outros ambientes diversos. São micro-organismos cosmopolitas e constituem um reino próprio devido às várias características que os diferenciam dos demais organismos. Eles desempenham um papel fundamental nos ecossistemas pela decomposição de matéria orgânica e além de sapróbios, há espécies que estabelecem relações de parasitismo com plantas, animais e até mesmo outros fungos, ou aqueles que vivem em simbiose como, por exemplo, os líquens e as micorrizas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; BLACKWELL, 2011).

Uma das características mais marcantes deste reino é o modo de nutrição absorptiva ou osmotrófica com digestão extracorpórea parcial. Ademais, podem ser organismos unicelulares como as leveduras que apresentam formato de esférico a elipsoide, cujo diâmetro varia de 3 a 15 μm (figura 1). Ou pluricelulares como, por exemplo, os fungos filamentosos (grande maioria das espécies) cuja morfologia celular difere totalmente da célula leveduriforme. A massa filamentosa denominada de micélio, característica dos fungos filamentosos, é formada a partir de uma única

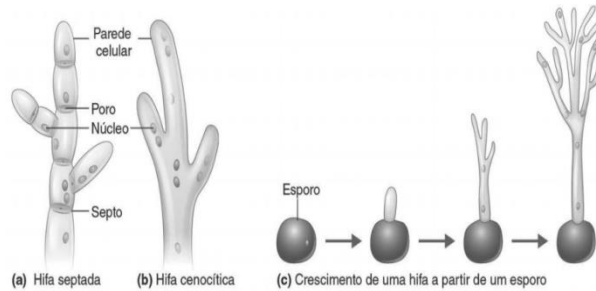
hifa, um tubo cilíndrico ramificado septado ou asseptado (cenocítico) cujo diâmetro varia de 2 a 10 μm e o crescimento se dá pelo alongamento de suas extremidades (figura 2) (GAMBALE, 2017; FRANÇA e LEITE, 2018).

Figura 1. Morfologia de uma célula leveduriforme.



Fonte: MADINGAN, 2016.

Figura 2. Características de uma hifa



Fonte: FRANÇA e LEITE, 2018.

As hifas podem apresentar-se também como mucodíneas, quando hialinas ou claras, ou demáceas, quando escuras ou negras. A presença de melanina nos fungos demácios confere proteção ao fungo contra os agentes oxidantes presentes nos tecidos e células de defesa do organismo colonizado. Desta forma, é considerado um fator de virulência importante para os fungos (MEZARRI e FUENTEFRÍA, 2012; BROOKS *et al.*, 2014).

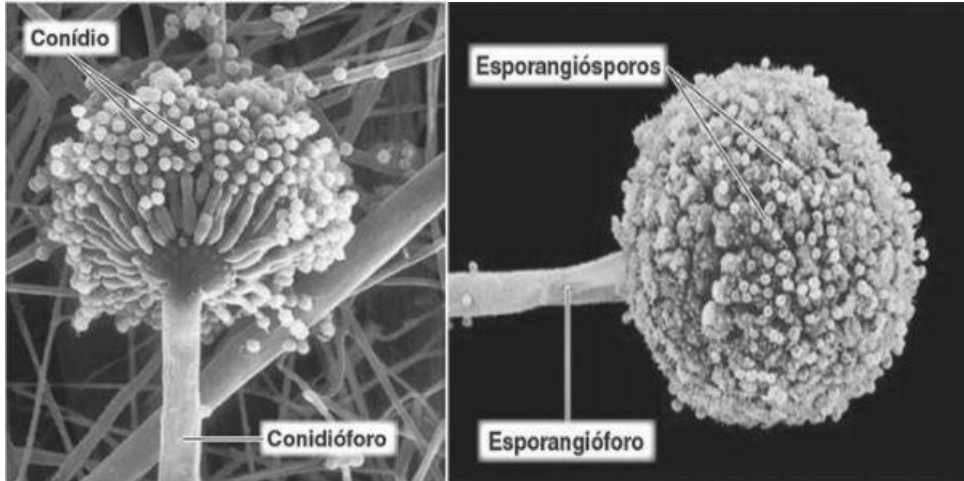
Os fungos filamentosos apresentam uma estrutura vegetativa, denominada de micélio vegetativo, responsável pela absorção dos alimentos e desenvolvimento fúngico, que comumente encontra-se no interior da matéria orgânica que está sendo degradada, e uma estrutura reprodutiva (hifa reprodutiva) que se encontra projetada para o ambiente externo, sendo responsável pela disseminação da espécie, por meio da formação de esporos sexuais (teleomórficos) ou assexuais (anamórficos) (GAMBALE, 2017; FRANÇA e LEITE, 2018).

Os esporos assexuais podem ser de dois tipos: os esporangiósporos, formados no interior de uma estrutura denominada esporângio (ex: *Rhizopus* e *Mucor spp.*) ou os conídios, formados a partir de um conidióforo (ex: *Aspergillus* e *Penicillium spp.*). A figura 3 demonstra as estruturas reprodutivas dos fungos supracitados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A reprodução assexuada é importante para a multiplicação e dispersão da espécie, enquanto a reprodução sexuada garante a variabilidade genética da progênie. No âmbito da reprodução sexuada há ainda algumas espécies dentro do

reino *Fungi* que podem produzir órgãos sexuais, denominados de gametângios, responsáveis pela formação de gametas (SANTOS, 2015).

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura dos conídios do fungo *Aspergillus niger* e esporângio do fungo *Rhizopus stolonifer*.



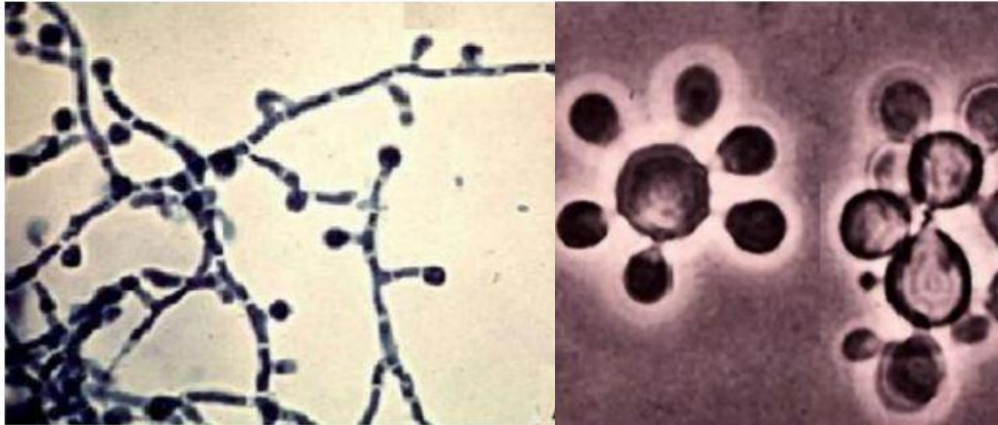
Fonte: FRANÇA e LEITE, 2018.

FRAMIL, 2017, aborda que as diferentes espécies microfúngicas existentes apresentam características morfológicas variadas quando inoculadas e crescidas em meio nutritivo adequado. Tais particularidades encontradas na morfologia das colônias fúngicas são utilizadas na identificação macro e microscópica dos fungos (FRAMIL, 2017). Para crescer, esses micro-organismos necessitam de condições favoráveis de temperatura, umidade, luminosidade, pH, concentrações de O₂ e CO₂, e nutrientes (FRANÇA e LEITE, 2018).

Há algumas espécies fúngicas que apresentam mudanças em sua morfologia conforme a temperatura e concentrações de CO₂ presentes no ambiente, e por isso são denominadas de fungos dimórficos (FRANÇA e LEITE, 2018).

O dimorfismo é quando um fungo filamentosos, sob determinadas condições ambientais, assumi a forma de uma levedura, diminuindo sua capacidade de filamentação e dividindo-se por brotamento. Esse comportamento é comum em algumas espécies potencialmente patogênicas para os seres humanos, como por exemplo, o fungo filamentoso *Paracoccidioides brasiliensis* (figura 4) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004).

Figura 4. *Paracoccidioides brasiliensis* (morfologia filamentosa à esquerda e levedura à direita)



Fonte: VOLK, 2002.

Os fungos patógenos apresentam a capacidade de invadir tecidos saudáveis, multiplicar e causar dano tecidual no hospedeiro, ou seja, micose. As micoses podem ocorrer por várias vias de contato como, por exemplo, por inalação ou quando a barreira epitelial é quebrada diante de um acidente com perfuro cortante ou traumatismo, permitindo a implantação direta do fungo na pele ou mucosa. Além deste tipo de infecção, denominada de infecção primária, há ainda as infecções oportunistas, ocasionadas quando o sistema imune enfraquecido do hospedeiro não consegue combater a espécie fúngica, que em condições normais não causaria doença no indivíduo colonizado (MEZARRI e FUENTEFRIA, 2012).

De acordo com a porta habitual de entrada e o local de comprometimento inicial, as micoses são classificadas em: superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. Das mais de 80.000 espécies fúngicas já descritas, pouco mais de 400 têm importância médica e menos de 50 espécies causam mais de 90% das infecções em seres humanos e animais (BROOKS *et al.*, 2014). O quadro abaixo aborda as principais micoses que acometem os seres humanos e os fungos responsáveis por desencadeá-las.

Quadro 2. As principais micoses de interesse médico e seus agentes etiológicos

Classificação	Micose	Principais Agentes etiológicos
Superficial	Pitíriase versicolor	Espécies de <i>Malassezia</i>
	Tinea negra	<i>Hortaea werneckii</i>
	Piedra branca	Espécies de <i>Trichosporon</i>
	Piedra negra	<i>Piedraia hortae</i>
Cutânea	Dermatofitose	Espécies de <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> e <i>Epidermophyton floco</i>

	Candidíase de pele, mucosa ou unhas.	<i>Cândida albicans</i> e outras espécies de <i>Cândida</i>
Subcutânea	Esporotricose	<i>Sporothrix schenckii</i>
	Cromoblastomicose	<i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecae pedrosoi</i> e outros.
	Micetoma	<i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> e outros.
	Feoifomicose	<i>Exophiala</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Exserohillum</i> e outros bolores demácios.
Endêmica (primária, sistêmica)	Coccidioidomicose	<i>Coccidioides posadassi</i> e <i>Coccidioides immitis</i>
	Histoplasmose	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Blastomicose	<i>Blastomyces dermatidis</i>
	Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Micoses oportunistas		
Candidíase sistêmica, Criptococose, Aspergilose, Hialoifomicose, Feoifomicose, Mucormicose, Pneumonia por <i>Pneumocystis</i> e Penicilose.		

Fonte: Adaptado de BROOKS *et al.*, 2014.

1.1.1 Técnicas de cultivo e isolamento fúngico

O sucesso no isolamento e identificação fúngica depende de vários fatores como, por exemplo, da representatividade da amostra, do volume adequado, dos cuidados com a assepsia durante a coleta do material, do transporte e da qualidade dos métodos laboratoriais. Embora a observação do fungo na amostra biológica tenha um enorme valor diagnóstico, nos casos em que o volume do material é insuficiente para o exame microscópico e para a cultura do microrganismo, a cultura deve ter prioridade, pois é comumente o método de maior especificidade e sensibilidade (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004).

Para a cultura do fungo, é indispensável que a semeadura do inóculo fúngico seja realizada em meio de cultura adequado, cabendo ao microbiologista sua escolha, pois cada material biológico apresenta suas particularidades quanto ao crescimento primário (FRAMIL, 2017).

Os meios de cultura podem ser subdivididos em: a) meios enriquecidos não seletivos: que permitem o crescimento da maioria dos micro-organismos que não possuem exigências nutricionais complexas; b) seletivos: utilizados para o isolamento de micro-organismos específicos e inibição dos micro-organismos indesejáveis; c) diferenciais: a estes meios são adicionados componentes que permitem diferenciar micro-organismos estritamente relacionados; e d) meios especializados: utilizados para o crescimento de micro-organismos que necessitam

de nutrientes específicos para seu desenvolvimento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). O quadro 3 (três) demonstra as principais características de alguns dos meios de cultura habitualmente utilizados na área de micologia.

Quadro 3. Meios de cultura utilizados no cultivo dos fungos filamentosos e leveduriformes

Meio de cultura	Características
Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)	Meio básico, que contém glicose ou dextrose e peptona modificada, de pH 5,5 (quando composto por 4% de glicose) e 6,5 (quando composto por 2% de glicose). É utilizado para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras. O ASD não é seletivo, desta forma, permite o crescimento de fungos patogênicos e oportunistas.
ASD com Cloranfenicol	Meio também utilizado para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras, porém a presença do antimicrobiano cloranfenicol impede o crescimento indesejável de bactérias. Desta forma, é um meio muito utilizado nos laboratórios por ser seletivo para fungos.
ASD com Cloranfenicol e Cicloheximida	Meio seletivo para fungos patogênicos. A presença do cloranfenicol impede o crescimento de bactérias e a presença da cicloheximida inibe parcialmente ou totalmente o crescimento de fungos anemófilos (fungos presentes no ar atmosférico).
CHROMagar	Meio seletivo e diferencial utilizado para o isolamento e identificação de espécies de <i>Cândida spp.</i> em amostras biológicas contaminadas, como por exemplo, secreções vaginais e urinas. As diversas espécies de <i>Cândida</i> possuem enzimas que ao utilizar os substratos cromogênicos do meio liberam compostos corados que produzem colônias coloridas. Ex: <i>Cândida albicans</i> – colônias verdes Ex: <i>Cândida tropicalis</i> – colônias roxas Ex: <i>Cândida krusei</i> – colônias rosa claro
Ágar batata dextrose (BDA)	Indicado para o isolamento ou subcultivo de fungos hialinos, demáceos e <i>Zygomycetes</i> . O BDA é um dos meios mais utilizados em micologia médica para esporulação e produção de pigmentos de diversos fungos oportunistas e patogênicos.
Ágar infusão de cérebro-coração (BHI) e Caldo BHI	Meio muito rico em nutrientes indicado para fungos dimórficos de crescimento lento, ou seja, superior a 15 dias. O BHI melhora o desenvolvimento das culturas reduzindo o tempo de crescimento. O caldo BHI difere do ágar BHI apenas por não conter ágar.

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014.

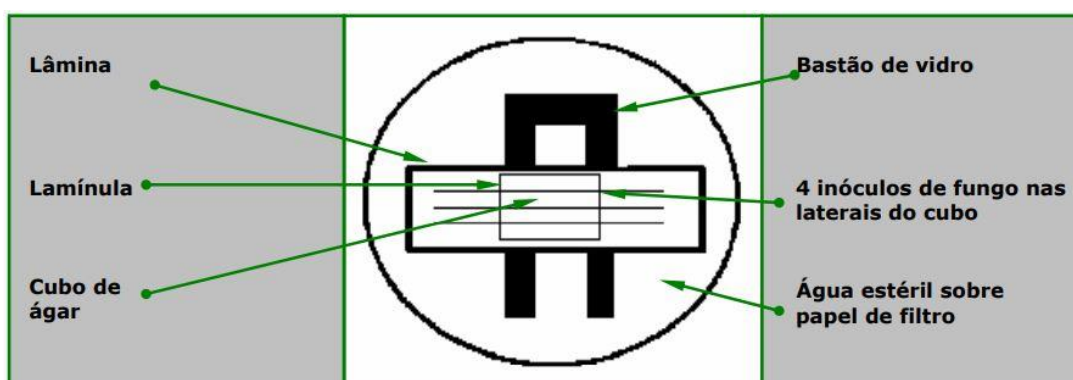
Já a transferência dos inóculos para a superfície do meio de cultura deve ocorrer por meio de alça estéril, alça de níquel-cromo ou fio dobrado na ponta em ângulo de 90° e em estriamento zigzague, técnica de semeadura que permite a separação de possíveis contaminantes da amostra (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004).

Além dos cuidados com a escolha do meio de cultura para o isolamento do fungo e técnica correta de semeadura, faz-se necessário também garantir a incubação do tubo de ensaio e/ou placa de Petri em condições ótimas de temperatura, ou seja, entre 20 a 30°C para o *primo* isolamento (SANTOS, 2015).

A determinação de gênero e espécie fúngica isolada se dá pela observação da taxa de crescimento, aparência macroscópica e morfologia microscópica do fungo. Sendo que as características fenotípicas mais úteis são as estruturas conidiogênicas e a morfologia dos esporos reprodutivos (BROOKS *et al.*, 2014). Ambos (estruturas conidiogênicas e esporos) podem ser visualizados por meio da técnica de microcultivo em lâmina, que preserva a formação original dos esporos sobre as hifas e mantém a integridade dos elementos que formam os esporos (FRANÇA e LEITE, 2018).

A técnica de microcultivo em lâmina consiste em colocar sobre uma lâmina estéril, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar ASD ou ágar BDA. A lâmina precisa ser colocada sobre um suporte (conforme demonstrado na figura 5), e a amostra do fungo deve ser semeada nos quatro lados do cubo de ágar que após deve ser recoberto com uma lamínula estéril. Antes de tampar a placa de Petri para a incubação em temperatura ambiente por 7 a 10 dias, faz se necessário umedecê-la, logo, deve se colocar de 1 a 2 mL de água destilada estéril no fundo da placa de Petri ou colocar um pequeno chumaço de algodão embebido em água (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004).

Figura 5. Técnica de Microcultivo em lâmina



Após o período de incubação, inativa-se a esporulação, ou seja, adiciona-se 1 mL de formol ao algodão e veda-se com fita adesiva a placa de Petri por 24h a 48 horas. Para que possam ser observadas as hifas e os esporos, a lamínula precisa ser retirada e uma gota do corante lactofenol azul de algodão adicionada. A lamínula é montada sobre uma lâmina e ao microscópio óptico permite a visualização do perfil das hifas e esporos formados conforme a espécie fúngica (FRANÇA e LEITE, 2018). Além do método fenotípico (microscopia e cultura), podem ser utilizados métodos moleculares no diagnóstico, como, por exemplo, a identificação de sequências de DNA do microrganismo (BROOKS *et al.*, 2014). O quadro 4 aborda os tipos de exames microscópicos realizados na identificação de gênero e espécie fúngica (FRANÇA e LEITE, 2018).

Quadro 4. Exames microscópicos para identificação fúngica

Método	Amostra
Exame microscópico direto com Hidróxido de potássio KOH a 20%	Pelos, pele, unhas, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos.
Exame microscópico direto com tinta nanquim	Líquor, urina, secreções ou exsudatos para visualização de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .
Exame microscópico com coloração pelo método de Gram	Urina, secreções e fezes.
Exame microscópico com coloração panótica (Giemsa, Leishman, Wright)	Medula óssea, sangue, aspirados e secreções cutâneas.

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004.

1.2 Bactérias

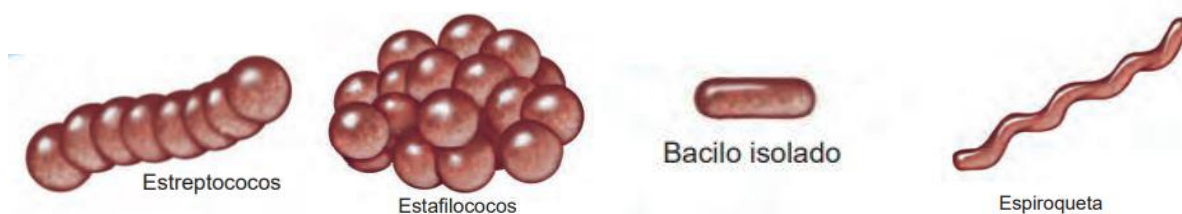
As bactérias são micro-organismos unicelulares com tamanho comumente variável de 0,2 a 5 μm e, ao contrário dos eucariotos, o material genético das bactérias é um cromossomo simples, circular e encontra-se disperso no citoplasma, ou seja, o DNA bacteriano não é circundado por uma membrana. Estes micro-organismos também não possuem organelas membranosas e multiplicam-se por fissão binária (ENGELKIRK e DUBEN – ENGELKIRK, 2012). A divisão binária é característica comum de grande parte das bactérias, todavia, há algumas famílias, em especial as *Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae* e *Chlamydiaceae* que necessitam

da maquinaria da célula hospedeira para sua replicação, pois são parasitas intracelulares obrigatórios (PROCOP *et al.*, 2018).

Na maioria das bactérias conhecidas, a obtenção de energia ocorre por meio de reações químicas de oxidação de compostos orgânicos e desta forma são denominadas de organotróficas, contudo, há bactérias que oxidam compostos inorgânicos e são chamadas de litotróficas. Quanto à utilização do oxigênio nos processos de respiração, as bactérias podem ser aeróbias, microaerófilas—exigem pequena quantidade de oxigênio, não tolerando as pressões normais de O₂ atmosférico—, anaeróbias obrigatórias, anaeróbias não obrigatórias e facultativas (ALTERTHUM, 2015).

Esses organismos apresentam morfologia diversa, mas, de modo geral, podem ser divididos em três grupos básicos: cocos, bacilos e espiroquetas. Além da forma, o arranjo das células também difere muito e é determinado pelos planos em que a célula bacteriana se divide e pela espécie. A figura 6 demonstra as três formas básicas destes organismos, sendo que os cocos são demonstrados em arranjo de cadeia e de cachos, característico dos estreptococos e estafilococos respectivamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

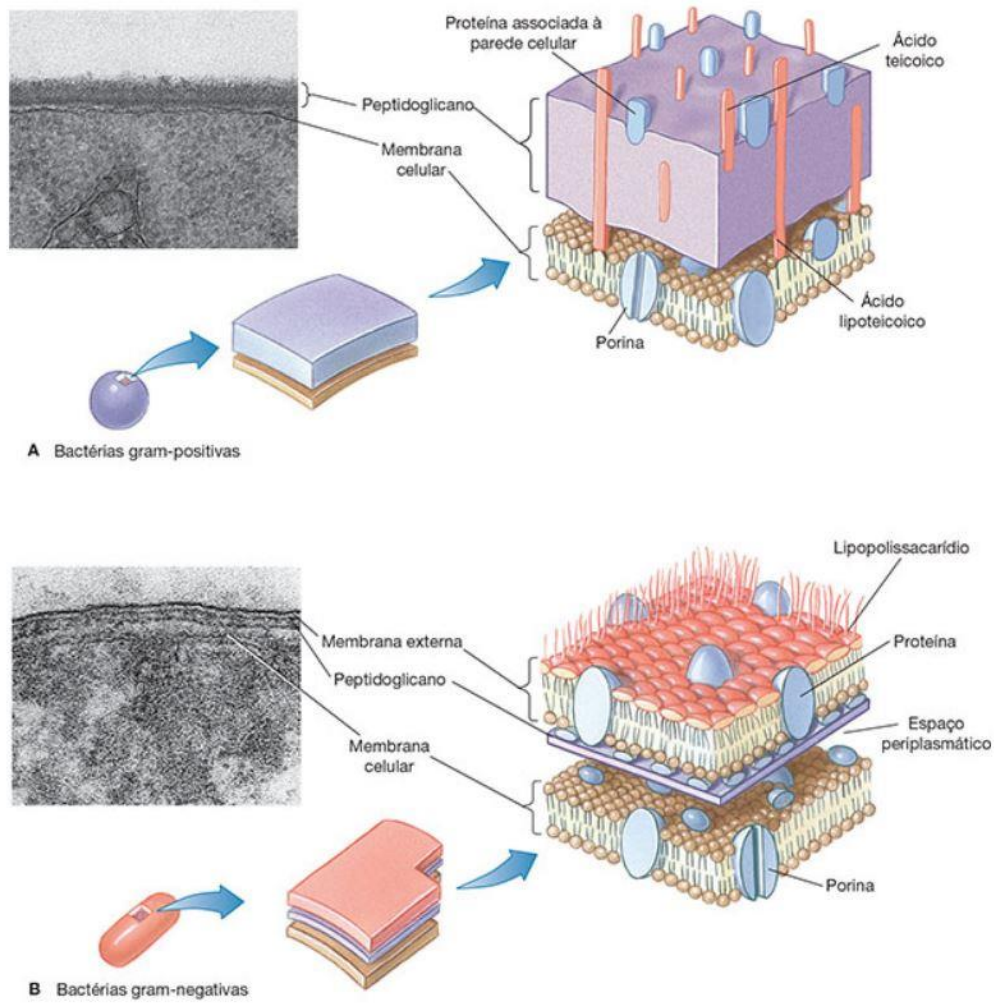
Figura 6. Morfologia e arranjo das células bacterianas



Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Já a parede celular bacteriana é composta por peptidoglicano, um polissacarídeo complexo, essencial à constituição das células bacterianas e, por isso, muito utilizado como alvo para fármacos antibacterianos. A estrutura, composição química e espessura da parede celular dividem as bactérias em dois grupos principais: Gram-positivas e Gram-negativas (figura 7) (LEVINSON, 2016).

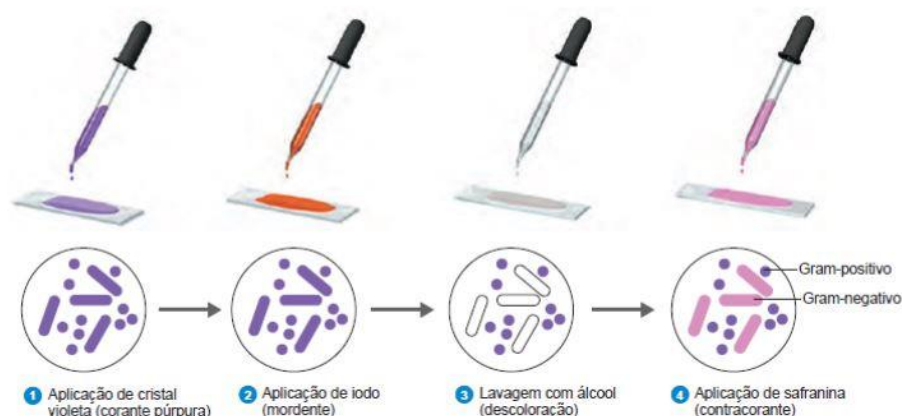
Figura 7. Diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas



Fonte: BLACK, 2021.

As bactérias Gram-positivas apresentam 90% da sua parede celular composta de peptidoglicano. As camadas sobrepostas de mureína das bactérias Gram-positivas conferem rigidez e resistência à célula. Quando corada pelo método de coloração de Gram apresenta-se na cor roxo-violeta, pois a camada espessa de peptidoglicano resiste à ação do álcool (agente descolorante), ao contrário das bactérias Gram-negativas, que apresentam destruição da sua fina parede celular após a etapa de descoloração (figura 8) (MADIGAN *et al.*, 2016).

Figura 8. Etapas da técnica de coloração de Gram



Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

A técnica de coloração de Gram foi desenvolvida em 1883 pelo Dr. Hans Christian Gram, sendo de extrema relevância nos laboratórios de microbiologia deste período e, com todo o avanço tecnológico, atualmente se mantém um método amplamente empregado, pois permite classificar as bactérias com base no tamanho, morfologia e comportamento diante dos corantes e as diferencia de células leveduriformes que também se coram pelo GRAM (ENGELKIRK e DUBEN – ENGELKIRK, 2012).

Na técnica de coloração de Gram, o cristal-violeta (corante primário) é utilizado para corar de roxo as estruturas celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; o lugol, também chamado de mordente, apresenta a propriedade de formar grandes cristais com o corante primário impedindo que ele atravesse a parede celular bacteriana; o agente descolorante, habitualmente composto por álcool combinado com um solvente orgânico variando entre éteres e cetonas, é responsável por dissolver os lipopolissacarídeos e lipoproteínas da membrana externa, assim como pela abertura de poros na parede celular de bactérias Gram-negativas; e a safranina ou fucsina (corante secundário) tem a finalidade de corar as bactérias que sofreram com a ação do agente descolorante. O resultado final observado ao microscópio óptico permite a visualização de bactérias Gram-positivas coradas em roxo e as Gram-negativas em rosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Alguns exemplos de bactérias Gram-positivas são: *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Bacillus sp.* e como exemplos de Gram-negativas têm-se: *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Neisseria sp.* e *Klebsiella sp.* As figuras 9 e 10 (abaixo) mostram as bactérias *Escherichia coli* e

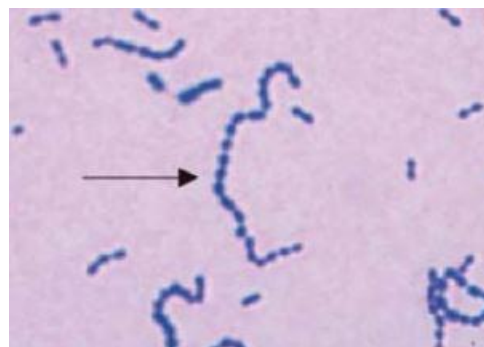
Streptococcus pyogenes corados pelo método de coloração de Gram (LEVINSON, 2016).

Figura 9. *E. coli* corada pelo Gram



Fonte: BROOKS *et al.*, 2014.

Figura 10. *S. pyogenes* corado pelo Gram



Fonte: Levinson, 2016.

Outra técnica de coloração de grande importância na bacteriologia é a técnica de coloração Ziehl-Neelsen, utilizada na diferenciação do gênero *Mycobacterium*. As bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* apresentam elevado conteúdo lipídico e são denominadas de BAAR – bactérias álcool-ácido resistentes, pois são resistentes à ação do agente descolorante, mantendo íntegras suas paredes celulares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Segundo Procop e colaboradores, 2018, a introdução do uso de corantes biológicos em meados do século XIX proporcionou avanços significativos na área da microbiologia clínica e microscopia diagnóstica em diferentes áreas. No laboratório de Microbiologia, sua utilização pode fornecer ao médico um diagnóstico presuntivo imediato e nortear o microbiologista na escolha dos meios de cultura adequados com base no microrganismo detectado (PROCOP *et al.*, 2018).

1.2.1 Técnicas de cultivo e isolamento bacteriano

O crescimento *in vitro* de bactérias é conseguido pela semeadura do inóculo em meios de cultura que podem ser utilizados na forma líquida, semissólida ou sólida pela adição de um agente solidificador como o ágar. Além disso, a composição do meio deve atender as exigências nutricionais do microrganismo que se pretende isolar (ALTERTHUM, 2015). O microbiologista deve observar também o material clínico (ex. fezes, urina, lavado brônquico, sangue, ponta de cateter, entre outros) que será utilizado, antes da escolha do meio de cultura (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004).

Algumas bactérias podem crescer em uma diversidade de meios de cultura, outras irão necessitar de meios especiais, contudo, para algumas bactérias ainda não há um meio de cultura que permita seu crescimento, como por exemplo, a bactéria *Treponema pallidum*, que até o presente momento não foi cultivada *in vitro* continuamente em meios artificiais, ovos férteis ou cultura de tecidos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; BROOKS *et al.*, 2014). O quadro cinco apresenta os principais meios de cultura utilizados para crescimento e isolamento bacteriano.

Quadro 5. Meios de cultura sintéticos utilizados no crescimento e isolamento bacteriano

Meio de Cultura	Características
Ágar sangue	Meio rico e não seletivo, permite o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos filamentosos e leveduriformes. Pode ser utilizado como diferencial para observação de hemólise.
Ágar chocolate	Meio rico e não seletivo, permite o crescimento da maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO ₂ favorece o crescimento de bactérias microaerófilas. Permite o crescimento de micro-organismos muito exigentes como <i>Haemophilus spp.</i> O ágar chocolate recebe esse nome devido à sua coloração marrom. Sendo o meio constituído de sangue lisado de carneiro, cavalo ou coelho.
Ágar Muller-Hinton	Meio não seletivo de uso rotineiro nos laboratórios recomendado para o teste de suscetibilidade das bactérias aos antimicrobianos.
Caldo Tioglicolato	Meio rico e não seletivo, favorece o crescimento de vários micro-organismos aeróbios, anaeróbios e microaerófilos.
Ágar MacConkey	Meio seletivo para bactérias Gram-negativa e diferencial para a utilização de lactose, ou seja, bactéria lactose positiva – colônia de coloração avermelhada, bactéria lactose negativa – colônia de coloração inalterada.
Ágar Salmonela-Shigella	Meio seletivo para <i>Salmonela</i> e <i>Shigella</i> e diferencial para utilização da lactose (bactérias que fermentam a lactose produzem ácido que na presença do indicador vermelho neutro formam colônias de coloração rosa) e produção de sulfeto de hidrogênio H ₂ S (colônia de coloração negra).
Ágar Hecktoen Enteric	Meio seletivo para <i>Salmonela</i> e <i>Shigella</i> e diferencial para utilização da lactose (colônia de coloração alaranjada) e produção de sulfeto de hidrogênio H ₂ S (colônia de coloração negra).
Ágar Thayer-	Meio seletivo para <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Neisseria</i>

Martin	<i>gonorrhoeae</i> , inibe o crescimento de <i>Neisserias</i> saprófitas e outras bactérias.
Ágar Löwenstein Jensen	Meio seletivo para micobactérias, como por exemplo, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Mycobacterium leprae</i> .
Ágar manitol	Meio seletivo para estafilococos, pois o gênero consegue sobreviver em elevadas concentrações de sal e diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i> que pode fermentar o manitol, produzindo colônias amareladas neste meio.
Caldo Lim	Meio especializado para recuperação de <i>Streptococcus agalactiae</i> .
Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS)	Meio especializado para recuperação de espécies de <i>vibrio</i> .
Ágar Regan-Lowe	Meio especializado para recuperação de <i>Bordetella pertussis</i> .
Ágar extrato de levedura em carvão tamponado (BCYE)	Meio especializado para recuperação de <i>Legionella</i> e <i>Nocardia</i> .

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014.

O cultivo bacteriano em meios de cultura permite a identificação presuntiva de grupos ou espécies, como a diferenciação de bactérias Gram-negativas fermentadoras de lactose das não fermentadoras (YOKOMIZO *et al.*, 2019). Muitas vezes, para auxiliar na identificação da espécie bacteriana, faz-se necessário a realização de testes bioquímicos, assim denominados, pois pesquisam o perfil bioquímico de uma bactéria, ou seja, a presença de enzimas metabolizadoras. Comumente, a metabolização de uma molécula resulta em produtos finais ácidos que provocam alteração nos indicadores de pH presentes nos meios de cultivo ocasionando mudança de cor que ajuda na caracterização e reconhecimento do microrganismo (GEMELLI, 2020).


Alguns exemplos de provas bioquímicas amplamente utilizadas na identificação de cocos Gram positivos são: a prova da catalase utilizada na diferenciação entre estreptococos (catalase negativas) e estafilococos (catalase positivas), prova da coagulase usada para distinguir *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) de outras espécies de estafilococos (coagulase negativas), o teste da novobiocina utilizado na diferenciação de *Staphylococcus saprophyticus*

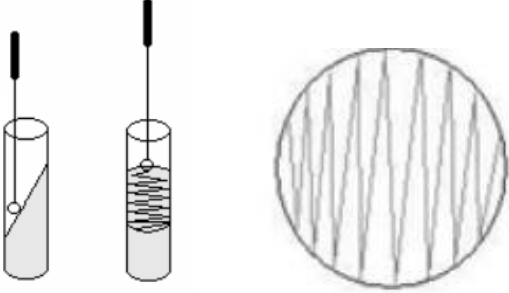
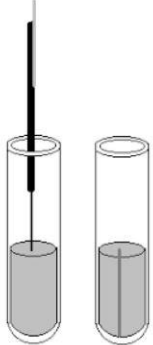
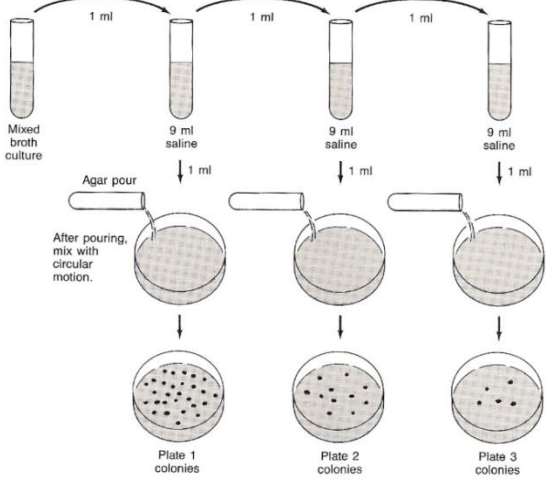
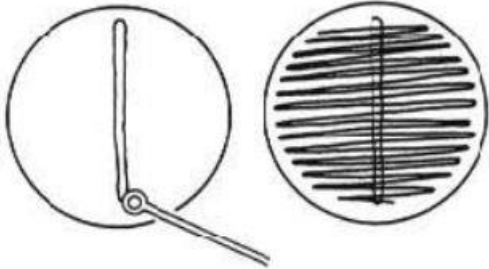
(resistente ao antibiótico) de outros estafilococos coagulase negativos, o teste da bacitracina, que diferencia de forma presuntiva espécies de estreptococos β -hemolíticos do grupo A (*S. pyogenes*) sensíveis ao antibiótico bacitracina, entre outros testes (HOLANDA *et al.*, 2017).

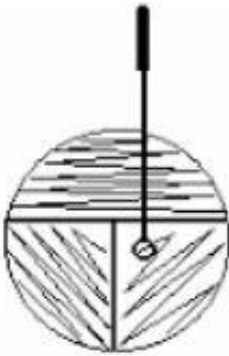
Os testes bioquímicos são também muito utilizados na identificação de bastonetes Gram negativos, como por exemplo, as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceas*. Família composta por aproximadamente 42 gêneros e mais de 100 espécies de bacilos gram-negativos (BGN). Alguns exemplos de testes bioquímicos para BGN são: verificação da capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono (nesta prova bioquímica é utilizado o ágar Citrato de Simmons); produção de uréase (utilização do ágar de Christensen); descarboxilação da lisina; produção de gás; fermentação da lactose, entre outros (YOKOMIZO *et al.*, 2019).

Já a semeadura do inóculo em meio de cultura pode ocorrer por diversos métodos e deve ser escolhido com base no tipo de meio de cultura (líquido, semissólido ou sólido), no recipiente contendo o meio (tubo de ensaio ou placa de Petri), no tipo de análise (isolamento de cultura ou quantificação) e, no caso da microbiologia clínica, no tipo de amostra clínica e no tempo de transporte entre a coleta e o laboratório. O quadro abaixo (quadro 6) discorre sobre cada uma das técnicas de semeadura (YOKOMIZO *et al.*, 2019).

Quadro 6. Técnicas de semeadura

Método de semeadura	Descrição da técnica
Semeadura em meio líquido 	Por meio de uma alça bacteriológica transfere-se uma amostra da cultura bacteriana para o meio líquido presente no tubo de ensaio. E por último, agita-se sutilmente a alça no meio líquido.
Semeadura em meio sólido inclinado	Com o auxílio de uma alça bacteriológica faz-se um estriamento em zigue-zague na superfície do meio de cultura inclinado em tubo de ensaio ou meio de cultura em placa de Petri.

	
<p style="text-align: center;">Picagem profunda</p> 	<p>Esta técnica é utilizada em meio semissólido acondicionado em tubo de ensaio. Sendo necessário um fio de platina para furar (picada) no centro do meio até 2/3 da altura do tubo. O método é utilizado para verificação da motilidade das bactérias.</p>
<p style="text-align: center;">Pour plate</p> 	<p>Na técnica de <i>pour plate</i> faz-se diluições seriadas da suspensão contendo o microrganismo, de modo que a diluição final contenha aprox. 1000 organismos. Em seguida, coloca-se 1mL do meio líquido da diluição em 9mL de ágar fundido (45°C) e o meio é vertido em uma placa de Petri. O método permite a obtenção de colônias isoladas e a contagem do crescimento microbiano.</p>
<p style="text-align: center;">Semeadura para quantificação</p> 	<p>Nesta técnica faz-se uma única estria em toda a superfície do meio de cultura com alça calibrada de 1µl comumente e em seguida um estriamento em zigue-zague. O método permite quantificar as unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), uma vez que as colônias bacterianas ficam dispersas, facilitando a contagem.</p>
<p style="text-align: center;">Semeadura por esgotamento</p>	<p>Técnica para obtenção de culturas puras de microbios em placa de Petri contendo</p>

	<p>meio sólido. Por meio de uma alça bacteriológica o inóculo é depositado em um ponto na superfície do meio de cultura, e em seguida é estriado (ocupando 1/3 da área). A placa é rotacionada e o processo de estriamento repetido em mais duas ou três regiões. A alça não é recarregada entre os estriamentos para que o número de bactérias diminua e apareçam as colônias isoladas.</p>
---	--

Fonte: YOKOMIZO *et al.*, 2019

Para o ótimo crescimento e desenvolvimento das culturas são indispensáveis condições ideais de temperatura. Essas condições variam, pois existem bactérias que crescem melhor entre 0°C a 18°C (psicrófilas), 25°C a 40°C (mesófilas) e 50°C a 80°C (termófilas) (ALTERTHUM, 2015). Todavia, 36°C +/- 1°C é a temperatura ideal para incubação da grande maioria das bactérias da rotina de um laboratório clínico. Já o tempo de incubação pode variar de 24 a 72 horas dependendo do microrganismo que se pretende isolar. Há alguns gêneros que podem levar dias para crescer, como por exemplo, as micobactérias (cerca de 3 a 45 dias) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2004)

1.3 Vírus

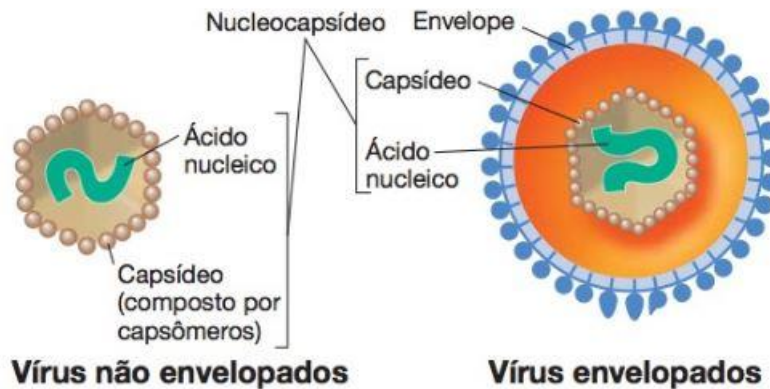
Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, dependentes do maquinário da célula do hospedeiro para a sua replicação, ou seja, fora da célula hospedeira (*bacteria, archaea ou eukarya*) um vírus é incapaz de se replicar (FERREIRA, 2015).

Por serem inertes fora da célula hospedeira, eles não apresentam a capacidade de produzir energia ou substratos como as bactérias e os fungos (FRANÇA e LEITE, 2018).

Estes organismos apresentam como estruturas principais: o capsídeo, o ácido nucléico viral, as proteínas virais e alguns vírus apresentam um envelope, ou seja, uma membrana externa formada por uma bicamada lipídica (figura 11) (MADINGAN, *et al.*, 2016). Sendo o vírion, uma partícula viral completa infecciosa, formada por

ácido nucléico, capsídeo e envelope (quando tratar-se de vírus envelopado) (RYU, 2017).

Figura 11. Morfologia de vírus não envelopado e envelopado

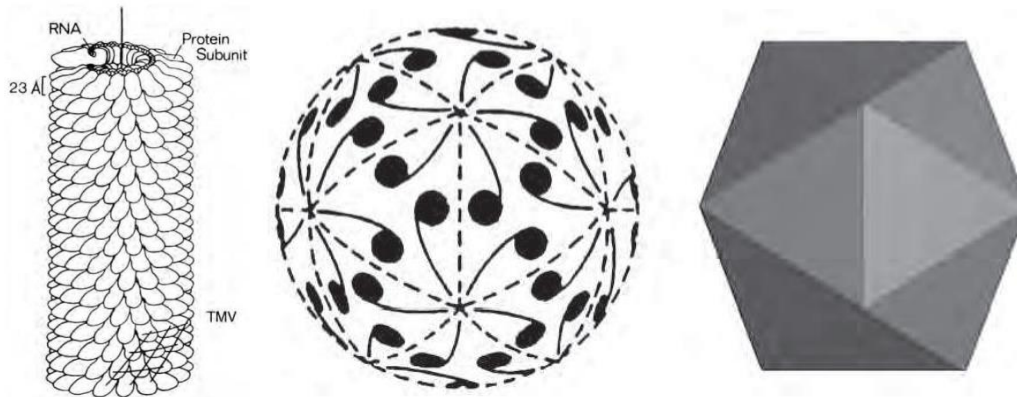


Fonte: MADINGAN *et al.*, 2016.

O capsídeo e o envelope são estruturas que conferem proteção ao material genético viral, além de funcionarem como veículo de liberação durante a transmissão do vírus de um hospedeiro para outro e mediar sua dispersão para a célula alvo dentro do hospedeiro. A remoção ou rompimento do capsídeo ou envelope viral culmina na inativação do vírus (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A morfologia dos vírions é bastante diversa quanto à forma, à composição química e ao tamanho. O capsídeo (que circunda o genoma do vírion) é formado por capsômeros, que são proteínas individuais que se organizam com muita precisão e repetitividade ao redor do material genético viral (BLACK, J. e BLACK, L., 2021). Esta organização dos capsômeros é altamente simétrica, sendo os dois tipos de simetria principais: a simetria helicoidal, e o vírion se apresentam na forma cilíndrica e a simetria icosaédrica, e os vírus se apresentam na forma esférica (figura 12) (HARRISON, 2001).

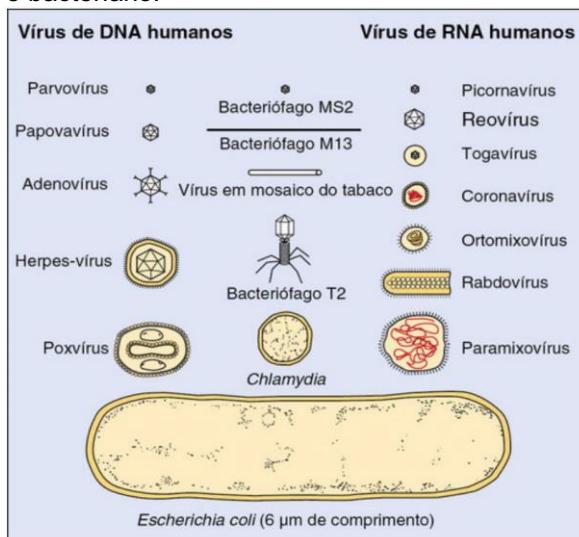
Figura 12. Vírus na forma cilíndrica (simetria helicoidal) e esférica (simetria icosaédrica).



Fonte: HARRISON, 2001.

No que se referem ao tamanho, os vírions de importância clínica, por exemplo, variam de 18 a 300 nanômetros, (ex: o Parvovírus e o Poxvírus, respectivamente). Sendo a maioria destes organismos menores que uma célula bacteriana (figura 13). Com exceção dos *Nucleocytoplasmic large DNA viroses* *NCLDV* (vírus gigantes) descobertos recentemente, os vírus são invisíveis na microscopia óptica (FERREIRA, 2015; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Figura 13. Morfologia de vírus de DNA e RNA que infectam humanos e comparação do tamanho viral e bacteriano.



Fonte: MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014.

Geneticamente apresentam-se como vírus de Ácido Ribonucleico – RNA (fita simples ou dupla fita) ou vírus de Ácido Desoxirribonucleico – DNA (fita simples ou dupla fita) (FRANÇA e LEITE, 2018). Contudo, recentemente, um grupo de pesquisadores descobriu um vírus híbrido, ou seja, formado de DNA e RNA (BLACK, J. e BLACK, L., 2021). O quadro abaixo mostra a família ou gênero de vírus que infectam vertebrados e características do material genético destes micro-

organismos, como por exemplo, se o genoma viral é de DNA ou RNA fita simples ou dupla fita, *senso positivo* ou *senso negativo*, se é linear ou circular, entre outros (figura 14).

Figura 14. Características das famílias ou gêneros que infectam vertebrados

Virus family or genera	Genome				Genome replication	
	Type	Polarity ^a	Topology ^b	Segments	Enzyme	Intracellular site
<i>Adenoviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Viral DdDp	Nucleus
<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	Negative	Circular	1	Cellular DdDp	Nucleus
<i>Astroviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Viral DdDp	Cytoplasm
<i>Circoviridae</i>	ssDNA	Negative or ambisense	Circular	1	Cellular DdDp	Nucleus
<i>Hepadnaviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Virion RdDp	Nucleus/cytoplasm
<i>Herpesviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Viral DdDp	Nucleus
<i>Iridoviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Viral DdDp	Nucleus/cytoplasm
<i>Papillomaviridae</i>	dsDNA	Both	Circular	1	Cellular DdDp	Nucleus
<i>Parvoviridae</i>	ssDNA	Either	Linear	1	Cellular DdDp	Nucleus
<i>Polyomaviridae</i>	dsDNA	Both	Circular	1	Cellular DdDp	Nucleus
<i>Poxviridae</i>	dsDNA	Both	Linear	1	Viral DdDp	Cytoplasm
<i>Arenaviridae</i>	ssRNA	Ambisense	Linear	2	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Arteriviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Astroviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Birnaviridae</i>	dsRNA	Both	Linear	2	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Bornaviridae</i>	ssRNA	Negative	Linear	1	Virion RdRp	Nucleus
<i>Bunyaviridae</i>	ssRNA	Negative or ambisense	Linear	3	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Caliciviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Coronaviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
Deltavirus genus	ssRNA	Negative	Circular	1	RNA pol II	Nucleus
<i>Filoviridae</i>	ssRNA	Negative	Linear	1	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Flaviviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Hepeviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Nodaviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	2	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Orthomyxoviridae</i>	ssRNA	Negative	Linear	6–8	Virion RdRp	Nucleus
<i>Paramyxoviridae</i>	ssRNA	Negative	Linear	1	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm
<i>Reoviridae</i>	dsRNA	Both	Linear	10–12	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Retroviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	2 identical	Virion RdDp	Nucleus/cytoplasm
<i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA	Negative	Linear	1	Virion RdRp	Cytoplasm
<i>Togaviridae</i>	ssRNA	Positive	Linear	1	Viral RdRp	Cytoplasm

DdDp, DNA-dependent DNA polymerase; ds, double-stranded; RdDp, RNA-dependent RNA polymerase; ss, single-stranded.

^aPolarity of the encapsidated genome.

^bTopology of the encapsidated genome—note that some circularize during replication.

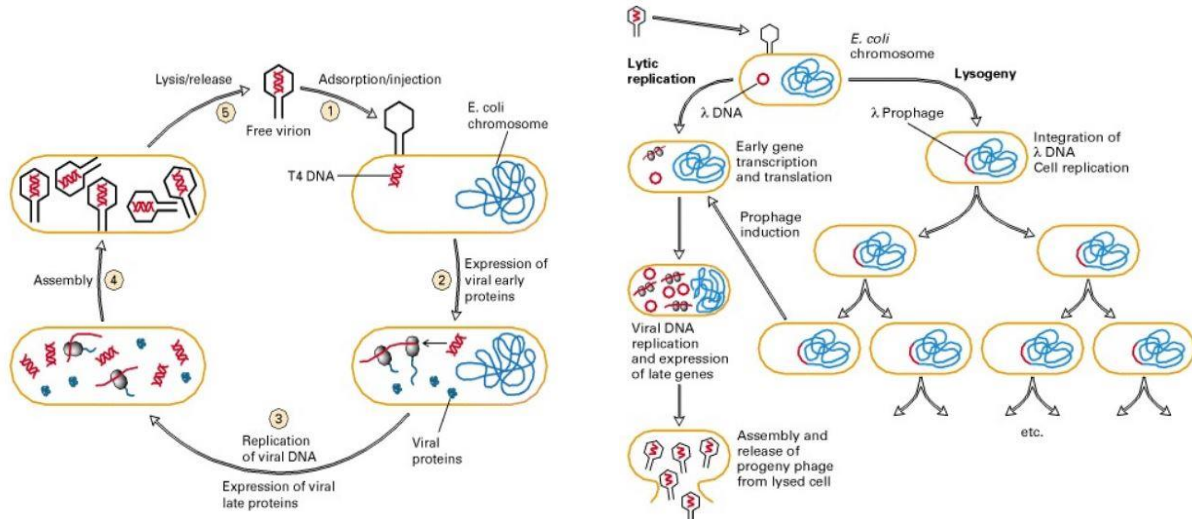
Fonte: CONDIT, 2001.

Com base no tipo celular que infectam, os vírus podem ser classificados em bacteriófagos ou *fagos* quando infectam bactérias, e vírus de animais ou vírus de vegetais quando infectam células animais e vegetais, respectivamente. A interação (ligação ou adsorção) entre as proteínas de superfície dos vírus e as proteínas receptoras das células hospedeiras determina a gama de hospedeiros de um vírus e iniciam o processo de infecção (LODISH *et al.*, 2000).

Após a fixação, penetração, tráfego citoplasmático e remoção do seu revestimento, o vírus utiliza o maquinário biossintético da célula hospedeira para sua

replicação. Podendo no processo destruir a célula (ciclo lítico) ou alterá-la geneticamente, ou seja, incorporar o genoma viral ao genoma do hospedeiro (ciclo lisogênico) (MADIGAN *et al.*, 2016; RYU, 2017). A figura 15 demonstra de forma detalhada as etapas de um ciclo lítico pela infecção de um bacteriófago T4 a uma *Escherichia coli* e as etapas do ciclo lítico e lisogênico do bacteriófago λ .

Figura 15. Ciclo lítico e infecção por bacteriófago T4 e ciclo lítico e lisogênico infecção por bacteriófago λ



Fonte: LODISH *et al.*, 2000.

O material genético de diversos vírus que infectam células animais também podem se integrar ao genoma da célula hospedeira, como por exemplo, os retrovírus, que são vírus envelopados, cujo material genético consiste em RNA dupla fita. Os retrovírus são assim denominados devido à síntese de DNA a partir do genoma de RNA, por meio da enzima denominada transcriptase reversa (LODISH *et al.*, 2000).

Como exemplo de retrovírus, cita-se o Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV (cepas HIV-1 e HIV-2). A infecção pelo HIV pode resultar na AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, doença que causa uma destruição do sistema imune do hospedeiro (BLACK, J. e BLACK, L., 2021).

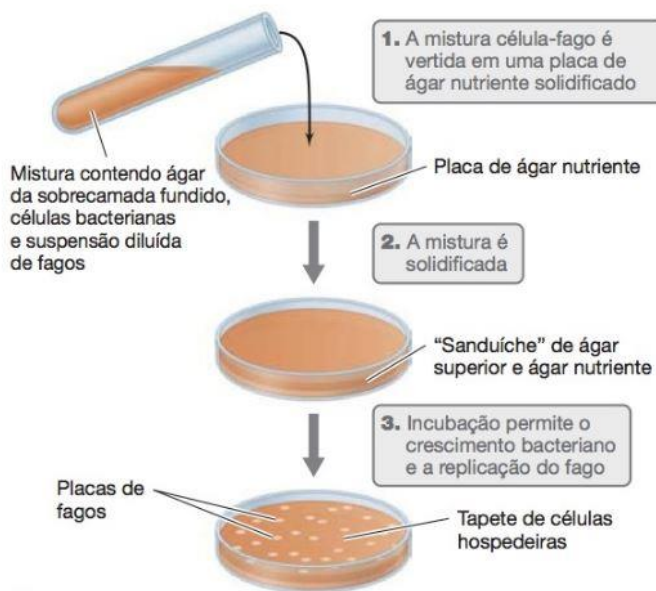
1.3.1 Técnicas de cultivo e isolamento de vírus

A replicação viral *in vitro* exige a preparação de culturas de tecidos animais, culturas puras de hospedeiros bacterianos ou outras células vivas, pois os vírus não se multiplicam em meios de cultura quimicamente sintéticos, como as bactérias e os fungos, por exemplo. Desta forma, o cultivo de células hospedeiras é necessário

para permitir que os vírus repliquem nas mesmas (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O crescimento viral em bactérias cultivadas em meio sólido é observado como uma área clara e bem delimitada sobre a superfície do meio de cultura, denominada de placa. Uma placa representa a infecção de um único vírion a uma célula hospedeira e consequente replicação do vírus, lise da célula e liberação de vírions descendentes. Esses vírions irão infectar células vizinhas reiniciando o ciclo e após alguns ciclos de infecção ocorre a formação da placa visível. A figura 16 demonstra as etapas de cultivo de um bacteriófago em meio sólido, assim como o crescimento viral que pode ser observado pelas placas (LODISH *et al.*, 2000).

Figura 16. Cultivo de *fago* em meio sólido



Fonte: MADIGAN *et al.*, 2016.

Para o cultivo de vírus de animais, comumente são utilizadas culturas de tecidos em laboratório ou linhas celulares (células imortalizadas que adquiriram a capacidade de proliferar indefinidamente) e em último caso são utilizados células primárias retiradas de um animal vivo (RYU, 2017).

1.4 Biblioteca de micro-organismos

Preservar culturas bacterianas por meio de técnicas simples e eficientes é uma atividade relevante nos laboratórios onde se desenvolvem atividades de ensino e pesquisa, e que necessitam dispor a qualquer momento de micro-organismos ou

espécimes para experimentos, trabalhos de rotina, aulas práticas, entre outros (ROMEIRO, 2006).

Para mais, se faz extremamente importante que a preservação e manutenção das culturas sejam feitas de forma a garantir a sobrevivência, estabilidade e pureza por longos períodos de tempo, conservando características genéticas e morfofisiológicas dos micro-organismos. Desta forma, o método de conservação escolhido deve inibir ou minimizar a ocorrência de mutações ou de variabilidades que possam refletir na patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (ABREU e TUTUNJI, 2003).

Dellaretti (2014), também enfatiza que o método de conservação de culturas microbianas deve além de preservar o estado inicial do microrganismo, alcançar a máxima preservação da viabilidade das células e o número de células viáveis (DELLARETTI, 2014).

Devido às peculiaridades intrínsecas de cada organismo, na teoria, os métodos de conservação deveriam ser específicos. Contudo, em nível de Laboratório, tal proposta seria impraticável. Logo, se faz necessário a adoção de técnicas de preservação testadas e recomendadas na literatura, eficientes para grupos de micro-organismos ou gêneros (ROMEIRO, 2006).

Segundo Silva e colaboradores (2015), as metodologias de conservação de micro-organismos são divididas de acordo com o tempo de preservação, ou seja, curto, médio e longo prazo. Sendo o subcultivo ou repicagem contínua, a preservação em óleo mineral e a criopreservação, respectivamente, exemplos de cada uma das técnicas (SILVA *et al.*, 2015).

O processo de subcultivo também conhecido como repicagem contínua, consiste na inoculação do microrganismo em um meio de cultura adequado, na incubação do tubo de ensaio em temperatura favorável à multiplicação microbiana e posteriormente a estocagem sob-refrigeração (5°C a 8°C). O intuito da refrigeração é reduzir o metabolismo dos micro-organismos, aumentando o intervalo de repique das culturas, favorecendo a conservação de culturas microbianas em média de um a três meses e de bactérias de cinco a doze meses (SOLA *et al.*, 2012).

Passador e colaboradores, (2010), aborda que as repicagens devem ocorrer antes do consumo completo do substrato e acúmulo excessivo de produtos de excreção oriundos do metabolismo microbiano que se comportam como mutagênicos (PASSADOR *et al.*, 2010).

A técnica de repicagem contínua apresenta como desvantagens a morte de algumas células bacterianas, o maior risco de contaminação em decorrência da constante manipulação das culturas e perdas de características genéticas decorrentes de mutações (QUINN *et al.*, 2007). Como vantagens, tem-se o baixo custo, a simplicidade de execução, a facilidade de manutenção (não sendo necessária a reativação) e a não exigência de equipamentos sofisticados (DELLARETTI, 2014).

É importante também atentar-se à idade das culturas, utilizando sempre culturas jovens, ou seja, que tenham entre oito a dez dias, pois culturas velhas tendem a produzir culturas-filhas alteradas tanto morfológica quanto fisiologicamente (TORRES, 2008).

Já as três principais metodologias de conservação de micro-organismos em médio prazo são: a preservação em óleo mineral, a manutenção em água destilada estéril ou método de Castellani e o congelamento comum (SILVA *et al.*, 2015).

A técnica de preservação em óleo mineral consiste na inoculação do micro-organismo em tubo de ensaio com tampa rosqueável contendo o meio de cultura adequado, na posterior incubação do tubo de ensaio em estufa, e após o crescimento microbiano, na aplicação de 1 a 2 cm de óleo mineral estéril sobre a cultura. O óleo mineral irá reduzir a quantidade de oxigênio disponível ocasionando a diminuição do metabolismo microbiano e conseqüentemente da taxa de multiplicação dos micro-organismos. A temperatura de conservação do meio após a adição do óleo mineral pode variar de 4°C a 20°C. E a recuperação da cultura é obtida pela transferência do crescimento microbiano para meio de cultura sólido ou líquido (SILVA *et al.*, 2015).

Esta técnica apresenta como vantagens, uma maior viabilidade dos micro-organismos quando comparada à técnica de repicagem contínua, e a desidratação do meio de cultura é significativamente menor. Todavia, apresenta as mesmas desvantagens do método de subcultivo, com um agravante que é o manuseio laborioso do óleo mineral (ROMEIRO, 2006).

Já o método de manutenção em água destilada estéril, também conhecido como método de Castellani, consiste na transferência de blocos de ágar de aproximadamente 7mm contendo os micro-organismos para frascos estéreis contendo 4mL de água destilada estéril. Após esta etapa, os frascos podem ser armazenados em temperatura ambiente. A técnica visa atingir um estágio de hipobiose, com a diminuição do metabolismo microbiano e formação do estado

latente da célula diante da restrição de nutrientes. A recuperação da cultura se dá pela retirada de uma alíquota da amostra presente no frasco e semeadura em meio de cultura (BELOTI, 2015).

Passador e colaboradores, (2010), abordam que o método de Cartellani tem apresentado resultados satisfatórios no que se refere à viabilidade das células, preservação das características originais da cultura por longos períodos, ausência de contaminação por ácaros micófagos, baixo custo e aplicação para grande número de gêneros e espécies fúngicas (PASSADOR *et al.*, 2010).

Um estudo conduzido por Diogo e colaboradores (2005), que avaliou a viabilidade de várias colônias fúngicas de relevância médica mantidas pelo período de um ano em água destilada estéril, demonstrou que passados os doze meses as 43 colônias foram recuperadas e apresentavam-se viáveis e com capacidade de esporulação. Além disso, todas as características morfológicas macroscópicas e microscópicas se mantiveram (DIOGO *et al.*, 2005).

Ainda como método de preservação de médio prazo, a técnica de congelamento comum restringe-se na inoculação de micro-organismos em tubo de ensaio contendo caldo BHI (infusão de cérebro-coração) com glicerol (agente crioprotetor), posteriormente, os tubos são mantidos em refrigeração por sete dias e por último, o congelamento a -20°C (SOLA *et al.*, 2012)

O congelamento reduz significativamente o metabolismo das células bacterianas, porém, a formação de cristais de gelo pode causar rompimento da estrutura celular e molecular da célula reduzindo a viabilidade de alguns micro-organismos, sendo esta a principal desvantagem da técnica e a grande importância de optar por métodos que tenham substâncias oleosas e/ou a base de leites. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; SOLA *et al.*, 2012).

Silva e colaboradores, (2008), analisaram a viabilidade celular de 328 cepas das leveduras dos gêneros *Cândida*, *Rodothorulla*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* semeadas em caldo BHI com 20% de glicerol, preservadas pelo método de congelamento comum (freezer a -20°C). Os resultados foram significativos demonstrando uma recuperação de 99,0% das cepas após três anos e três meses e seis meses de congelamento e 90,6% após quatro anos de congelamento (SILVA *et al.*, 2008).

Além de bons resultados na recuperação dos micro-organismos, o método apresenta ainda como vantagens o baixo custo, a facilidade na realização e

acondicionamento dos criotubos e a não exigência de equipamentos sofisticados (SILVA *et al.*, 2008; TORTORA *et al.*, 2011).

Como métodos de preservação de longo prazo citam-se a liofilização e a criopreservação. A técnica de liofilização consiste na dessecação rápida a partir da remoção de água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo capazes de causar danos às estruturas celulares (BELOTI, 2015). No processo, a utilização de substâncias protetoras também é necessária para a conservação da suspensão de esporos. Essa suspensão é gotejada sobre tiras de papel de filtro presentes no interior de ampolas de vidro, posteriormente acopladas no aparelho liofilizador e submetidas a condições de vácuo e temperaturas que variam de -40°C a -50°C para rápido congelamento (TORRES, 2008).

A liofilização apresenta como vantagens a escassez de contaminação por ácaros, a diminuição da variação de linhagens e a necessidade de pouco espaço para acondicionamento das ampolas. Contudo, a técnica pode ser utilizada apenas para fungos que produzem esporos e desde que os esporos sejam rijos (PASSADOR *et al.*, 2010).

Já a criopreservação consiste na manutenção de diversos tipos celulares (células animais, vegetais, fungos, vírus e bactérias) e tecidos a baixas temperaturas -20°C e -80°C em freezers, e a ultra-baixas temperaturas, -150°C a -196°C em tanques de nitrogênio líquido (DELLARETTI, 2014). Castro *et al.*, 2020 aborda que a criopreservação favorece a estocagem de micro-organismos por períodos prolongados e destaca-se como uma das técnicas mais utilizadas na conservação da biodiversidade microbiana (CASTRO *et al.*, 2020).

Segundo Girão e colaboradores (2004), a escolha acertiva do método de conservação permitirá análises fenotípicas e genotípicas proveitosas do microrganismo em longo prazo. Há vários estudos publicados sobre métodos de estocagem de micro-organismos, contudo, nenhuma técnica se apresenta completamente eficaz. Sendo sugerida pelo autor a associação de dois ou mais métodos de preservação para garantir a melhor recuperação das cepas (GIRÃO *et al.*, 2004).

1.5. Ensino em Microbiologia: conquistas e desafios

“A partir do século XIX a microbiologia apresentou notável desenvolvimento devido ao reconhecimento, pelo ser humano, da grande importância dos fungos, algas e bactérias” (PASSADOR *et al.*, 2010).

O estudo dos micro-organismos e conseqüentemente a compreensão dos seus processos vitais resultou em grandes conquistas para a humanidade, como, por exemplo, as vacinas, que praticamente erradicaram doenças muitas vezes fatais, e a descoberta dos antibióticos, importantes agentes terapêuticos na cura de doenças (BLACK, J. e BLACK, L., 2021).

Além disso, a utilização dos micro-organismos em processos de fabricação de alimentos, de recuperação de áreas contaminadas por poluentes e de produção de hormônios, interferons, entre outros, produzidos de forma econômica por meio de técnicas de engenharia genética são aplicações relevantes e que melhoraram a vida das pessoas (JACOBUCCI CARVALHO e JACOBUCCI, 2009).

A ciência da Microbiologia pode abordar temas com aspectos de natureza básica, prática ou aplicada, sendo fonte de produtos e processos benéficos para toda a população (KIMURA *et al.*, 2013).

No contexto atual, o desafio de proporcionar conteúdos práticos aos estudantes, é ainda maior, uma vez que a pandemia de COVID-19 trouxe consigo a necessidade do ensino remoto emergencial. Com isso, a grande preocupação dos professores de microbiologia é a incapacidade de oferecer aos discentes uma experiência típica do laboratório presencial (NOEL *et al.*, 2020).

“Os laboratórios fornecem aos alunos um ambiente de aprendizado estimulante para adquirir e desenvolver habilidades práticas que, de outra forma, seriam inatingíveis por meio de palestras e leituras” (BROCKMAN, *et al.*, 2020).

Para Noel e colaboradores, 2020, a utilização de vídeos demonstrando a técnica é uma ferramenta de ensino diante do cenário, porém, quando for seguro, as atividades práticas necessitam ser retomadas, pois a disciplina de microbiologia exige o refinamento da destreza manual, o domínio da técnica e a interação com os métodos, equipamentos e resultados experimentais (NOEL *et al.*, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Diante do papel essencial das aulas práticas como ferramenta facilitadora no processo de aprendizagem e da relevância dos resultados desses trabalhos práticos para a aplicação do conhecimento pelos discentes rotineiramente, seja em um Laboratório Clínico, em um Hospital, ou em outro ambiente, a proposta de melhorar os processos em um Laboratório de aulas práticas de Microbiologia de uma instituição de ensino torna-se necessária. As técnicas e conhecimentos em microbiologia são de essencial valor para os cursos da saúde, em especial nas aulas práticas de Microbiologia Geral, Microbiologia Clínica, Controle de Qualidade Microbiológico e Micologia/Virologia, ofertadas aos cursos de Medicina, Biomedicina, Farmácia, Nutrição, Odontologia e Enfermagem em uma das maiores instituições de ensino privada em expansão situada em Belo Horizonte – Minas Gerais, a FAMINAS-BH. A FAMINAS-BH dispõe de um centro de preparo de materiais com áreas que necessitam de melhoramento como a criação e manutenção de colônias de micro-organismos puros e bem caracterizados aplicáveis a aula prática para proporcionar melhor abordagem de conteúdos nas aulas práticas dos acadêmicos dos diversos cursos da área da saúde. Um catálogo contendo imagens das características macroscópicas e microscópicas das colônias e informações sobre aspecto da colônia, meio de cultivo, técnica de coloração utilizada, entre outras, também será confeccionado no intuito de melhorar e facilitar o aprendizado.

A criação da biblioteca de micro-organismos também permitirá o desenvolvimento de projetos de pesquisa e atividades de extensão.

Desta forma, é de fundamental importância para a instituição, que seja preparado um sistema para atender as aulas práticas, o que será tema desta dissertação de mestrado profissional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Criar uma biblioteca de micro-organismos e um catálogo com imagens dos micro-organismos utilizados em aula prática nos cursos de saúde.

3.2. Objetivos Específicos

- Criar uma biblioteca de micro-organismos para atender as aulas práticas dos cursos da área da saúde;
- Elaborar um catálogo contendo imagens das características macro e microscópicas das principais colônias de micro-organismos, assim como informações sobre aspecto da colônia, meio de cultivo adequado e técnica de coloração utilizada;
- Elaborar instruções de trabalho para a produção dos meios de cultura (sólidos, semi-sólidos e líquidos), preparados pelos funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia e disponibilizados para as aulas práticas dos diversos cursos da área da saúde.
- Padronizar o processo de congelamento, descongelamento e recuperação das bactérias e propor uma segunda metodologia de estocagem, garantindo maior preservação da vitalidade das células e número de células viáveis por mais tempo. Estabelecendo uma rotina de monitoramento da temperatura dos freezers.
- Elaborar POP's – Procedimento Operacional Padrão para os equipamentos do Laboratório de Microbiologia. Para aqueles equipamentos que já possuem o documento, propõem-se uma revisão dos mesmos.
- Elaborar POP's para as atividades de esterilização de materiais, descontaminação e limpeza do Laboratório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Na FAMINAS, um centro universitário em franca expansão, os materiais para as aulas práticas de Microbiologia são preparados no próprio laboratório de Microbiologia localizado no Bloco C, sala 206. Este Laboratório (figura 17) possui os seguintes equipamentos:

- Autoclave vertical CS c/ pedal 75 litros. Fabricante: Primatec. Nacionalidade: brasileira;
- Autoclave vertical s/ pedal 30 litros. Fabricante: Primatec. Nacionalidade: brasileira;
- Banho maria de bocas, digital controle microprocessado, até 110°C. Fabricante: Quimis. Nacionalidade: brasileira;
- Capela de fluxo laminar. Fabricante: Trox Technik. Nacionalidade: Alemã;
- Capela de segurança bacteriológica. Fabricante: Veco. Nacionalidade: brasileira;
- 2-Estufas de cultura bacteriológica. Fabricante: Quimis. Nacionalidade: brasileira;
- 2- Geladeiras.
- 15-Microscópio biológico binocular. Fabricante: Opton Anatomic. Nacionalidade: brasileira;
- 15- Microscópio biológico binocular, modelo E200. Fabricante: Nikon. Nacionalidade: japonesa;

Figura 17. Laboratório de Microbiologia da FAMINAS-BH



Fonte: autoria própria

Já os equipamentos e os materiais necessários para a montagem da biblioteca de micro-organismos e do catálogo encontram-se em sua grande maioria disponíveis no almoxarifado do laboratório e são relacionados abaixo no quadro 7.

Quadro 7. Materiais para montagem da biblioteca e catálogo de micro-organismos

Equipamentos e materiais permanentes	Disponível no Lab.	Investimento do aluno
Agitador tipo Vortex	Sim	
Alças de platina ou alça calibrada descartável	Sim	
Autoclave	Sim	
Bastão de vidro	Sim	
Bico de Bunsen	Sim	
Caneta para vidraria	Sim	
Caixa de papelão ou acrílico para armazenar microtubos	Sim	
Erlenmeyer	Sim	
Estante para tubos de ensaio	Sim	
Estufa bacteriológica	Sim	
Etiquetas para identificação dos tubos	Sim	
Frascos tipo penicilina	Sim	
Freezer -20°C	Sim	
Geladeira 4°C a 8°C	Sim	
Micropipetas de 200µL	Sim	
Microtubos	Sim	
Parafilm M rolo	Não, necessário	

	adquirir.	
Pipeta de Pasteur	Sim	
Ponteiras 100-1000 μ L	Sim	
Tubo de ensaio c/ tampa de rosca (capacidade 10 mL)	Sim	
Tubo de ensaio c/ tampa de rosca (capacidade 20 mL)	Sim	
Reagentes e meios de cultura		
Ágar nutriente	Sim	
Ágar Sabouraud com cloranfenicol	Sim	
Ágar Sal hipertônico manitol	Sim	
Ágar CLED	Sim	
10 Placas de Ágar cromogênico VRE	Não (necessário adquirir)	R\$ 81,60
Ágar Eosina azul de metileno – EMB	Sim	
Ágar MacConkey	Sim	
Água destilada	Sim	
Caldo BHI	Sim	
10 Placas prontas de Chomagar	Sim	R\$ 71,72
Glicerol	Sim	
Peróxido de hidrogênio 3%	Sim	
20 Placas de ágar sangue	Sim	R\$ 65,20
Plasma de coelho liofilizado	Sim	
Reagentes para coloração de Gram	Sim	
Outros recursos		
Identidade visual para o catálogo	Não (necessário adquirir)	R\$ 300,00

4.2. População microbiana atual e de interesse

Para o desenvolvimento desse estudo, foram utilizadas amostras da biblioteca de micro-organismos do departamento de microbiologia, incluindo bactérias Gram positivas e negativas, fungos filamentosos e leveduriformes e bacteriófagos B4 utilizados nas aulas práticas de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB). O laboratório de aulas práticas da FAMINAS-BH não possuía colônias de fungos filamentosos e leveduriformes, não possuía nenhuma cultura de vírus, e apresentava apenas uma amostra da bactéria *Escherichia coli* (bastonete Gram negativo) e uma amostra do coco Gram positivo *Staphylococcus aureus*. Tal situação era um fator limitante do conteúdo das aulas práticas dos cursos da área da saúde, principalmente para as aulas práticas de Micologia e Virologia. A criação e manutenção da biblioteca de micro-organismos proporcionarão conteúdos práticos para ambas as disciplinas, como por exemplo:

- Microcultivo de fungos filamentosos;

- Microscopia de leveduras;
- Microscopia de fungos de interesse médico;
- Bacteriófagos;

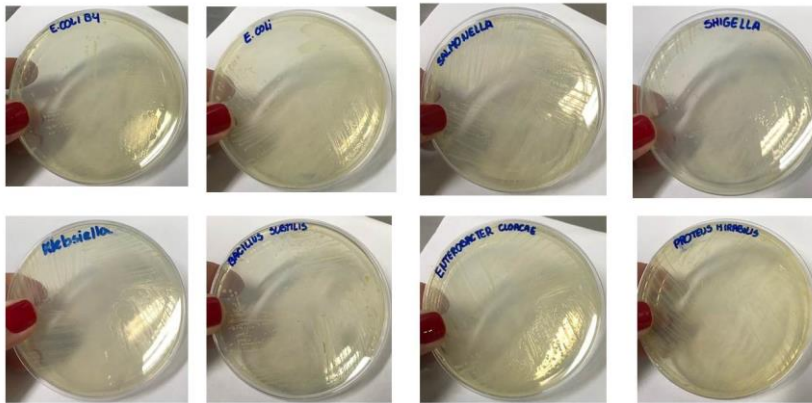
Desta forma, com base na proposta de aula das disciplinas de Microbiologia Básica, Microbiologia Clínica, Micologia, Virologia e Controle de Qualidade Microbiológico o quadro 8 mostra os micro-organismos de interesse para a coleção e como será catalogado em planilha no Excel. A figura 18 mostra algumas das amostras bacterianas e a figura 19 mostra colônias de fungos filamentosos e leveduriformes obtidos por doação do ICB e Instituto Hermes Pardini para o desenvolvimento deste projeto.

Quadro 8. Catálogo das amostras de micro-organismos de interesse

Código	Espécie	Origem	Número da caixa em freezer -20°C	Quant. De tubos
BAC001-2021	<i>Shigella sp.</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC002-2021	<i>Proteus sp.</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC003-2021	<i>Klebsiella sp.</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC004-2021	<i>Enterobacter sp.</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC005-2021	<i>Escherichia coli B4</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC006-2021	<i>Salmonella sp.</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC007-2021	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC008-2021	<i>Enterococcus faecalis</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC009-2021	<i>Staphylococcus aureus</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC010-2021	<i>Escherichia coli</i>	ICB	Caixa 1	6
BAC011-2021	<i>Proteus mirabilis</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6
BAC012-2021	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6
BAC013-2021	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6
BAC014-2021	<i>Streptococcus</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6

	<i>pneumoniae</i>			
BAC015-2021	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6
BAC016-2021	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hermes Pardini	Caixa 2	6
BAC017-2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ICB	Em construção	Em construção
BAC018-2021	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ICB	Em construção	Em construção
BAC019-2021	<i>Streptococcus sp.</i>	ICB	Em construção	Em construção
LEV001-2021	<i>Candida albicans</i>	ICB	Caixa 3	6
LEV002-2021	<i>Cândida krusei</i>	Hermes Pardini	Caixa 3	6
LEV003-2021	<i>Cândida tropicalis</i>	Hermes Pardini	Caixa 3	6
LEV004-2021	<i>Rhodotorulla sp.</i>	ICB	Em construção	Em construção
LEV005-2021	<i>Cryptococcus laurentii</i>	ICB	Em construção	Em construção
FUNG001-2021	<i>Aspergillus sp.</i>	ICB	Caixa 4	3
FUNG002-2021	<i>Cladosporium sp.</i>	ICB	Caixa 4	3
FUNG003-2021	<i>Curvularia sp.</i>	ICB	Caixa 4	3
FUNG004-2021	<i>Penicillium sp.</i>	ICB	Caixa 4	3
FUNG005-2021	<i>Rhizopus sp.</i>	ICB	Caixa 4	3
FAGO001-2021	Bacteriófago B4	ICB	Em construção	Em construção

Figura 18. Placas de Petri contendo amostras bacterianas



Legenda: Origem: ICB UFMG - Meio de cultura: ágar nutriente

Figura 19. Tubos de ensaio contendo amostras de leveduras e fungos filamentosos



Legenda: Origem ICB UFMG – Meio de Cultura: ágar Sabouraud

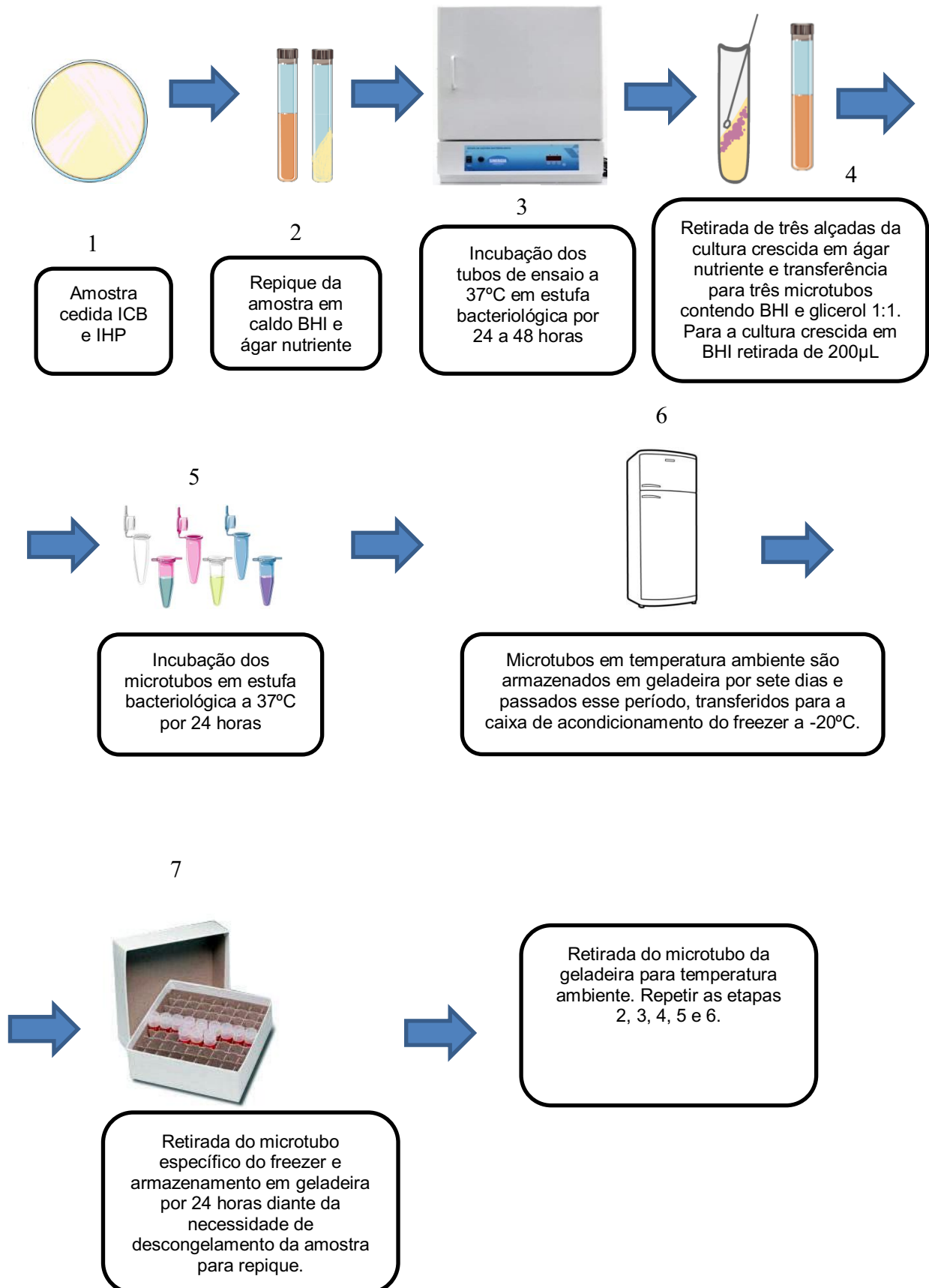
4.3. Preservação de culturas: Congelamento comum, Repicagem contínua e Método de Castellani

Uma vez que nenhuma técnica é completamente eficaz na conservação dos micro-organismos, no intuito de garantir a melhor recuperação das amostras será utilizada a associação de dois métodos de preservação.

Os métodos de preservação das amostras bacterianas e leveduriformes selecionados para a organização da biblioteca de micro-organismos foram o congelamento comum (figura 20) em associação com a repicagem contínua (figura 21). Embora a literatura consultada enfatize a criopreservação como uma das técnicas mais utilizadas na conservação da biodiversidade microbiana e estocagem de micro-organismos por períodos prolongados, o laboratório de Microbiologia da FAMINAS-BH não dispõe de ultra-freezer -80°C . Sendo assim, a técnica de congelamento comum será utilizada e a viabilidade celular será acompanhada.

Já para os fungos filamentosos, o método de Castellani será utilizado em conjugação com a repicagem contínua.

Figura 20. Fluxograma do processo de congelamento comum e descongelamento



Preservação de culturas bacterianas: congelamento comum: cada cultura bacteriana adquirida será repicada em ágar nutriente preparado em tubo de ensaio contendo 7mL de meio solidificado inclinado com bisel. E em um tubo de ensaio contendo 7mL de caldo BHI.

As culturas serão incubadas por 24 a 48 horas em estufa bacteriológica. Após o crescimento nos tubos de ágar nutriente e caldo BHI, serão preparados seis microtubos contendo 1mL de caldo BHI e 1mL de glicerol. Em três microtubos serão adicionados, utilizando a alça estéril, três alçadas da cultura crescida em ágar nutriente. Os microtubos serão identificados com o código da bactéria que deverá ser sequencial a partir do primeiro cultivo/ano do cultivo (exemplo: BAC001-2021). Nos outros três microtubos adicionar 200µl da cultura crescida em caldo BHI, e seguir com a mesma identificação citada anteriormente.

Na próxima etapa os microtubos serão incubados por 24 horas. E passados o período de incubação, estes serão armazenados em geladeira (4ª a 8ªC) por sete dias.

Após os sete dias, a caixa contendo os microtubos será armazenada em freezer a -20°C. Verificar fluxograma de congelamento (figura 20).

Culturas de leveduras: congelamento comum: cada cultura leveduriforme adquirida será repicada em ágar Sabouraud com cloranfenicol preparado em tubo de ensaio, contendo 7mL de meio solidificado inclinado com bisel. E em um tubo de ensaio contendo 7mL de caldo BHI.

As culturas serão incubadas por 24 a 48 horas em estufa bacteriológica. Após o crescimento nos tubos de ágar Sabouraud com cloranfenicol e caldo BHI, serão preparados seis microtubos contendo 1mL de caldo BHI e 1mL de glicerol. Em três microtubos serão adicionados, utilizando a alça estéril, três alçadas da cultura crescida em ágar Sabouraud. Os microtubos serão identificados com o código da levedura que deverá ser sequencial a partir do primeiro cultivo/ano do cultivo (exemplo: LEV001-2021). Nos outros três microtubos adicionar 200µl da cultura crescida em caldo BHI, e seguir com a mesma identificação citada anteriormente.

Na próxima etapa os microtubos serão incubados por 24 horas, após o período de incubação, serão armazenados em geladeira (4ª a 8ªC) por sete dias.

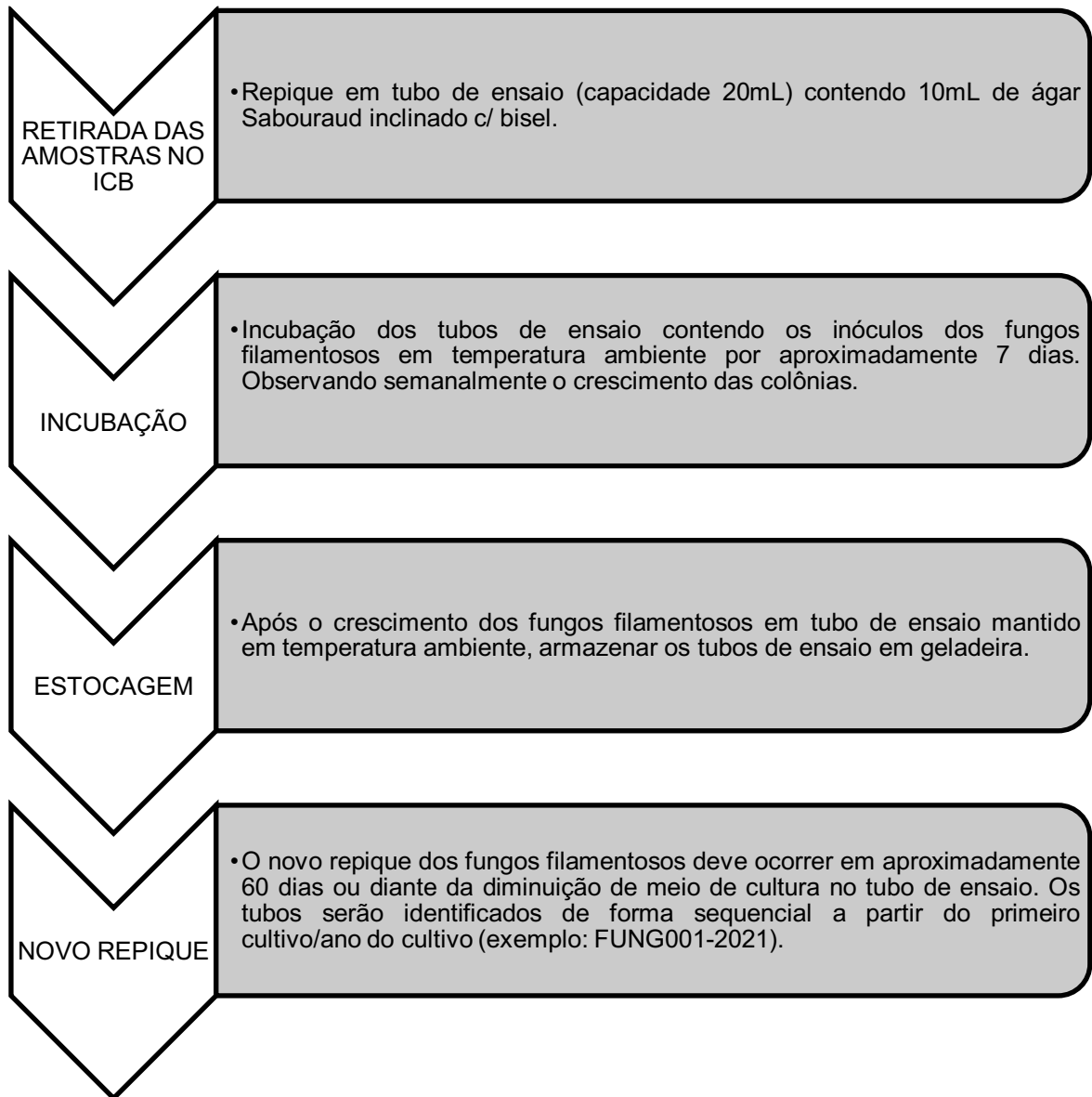
Ao final de sete dias, a caixa contendo os microtubos será armazenada em freezer a -20°C. Verificar fluxograma de congelamento (figura 20) alterando o tubo de ensaio de ágar nutriente por ágar Sabouraud.

Etapa de descongelamento para bactérias e leveduras: quando necessário realizar o descongelamento de um criotubo para repique, o microtubo específico será retirado do freezer e deixado por 24 horas na geladeira. Após 24 horas o tubo será retirado da geladeira e deixado em temperatura ambiente. Alcançado a temperatura ambiente o tudo será homogeneizado em agitador tipo vortex e três gotas inoculadas em um tubo contendo ágar nutriente ou ágar Sabouraud (dependendo do microrganismo que será recuperado) e 100µl em um tubo contendo caldo BHI.

Os tubos recém-inoculados serão incubados, sendo necessário após a verificação do crescimento microbiano, repetir o processo de congelamento para manutenção da biblioteca de micro-organismos. Verificar fluxograma (figura 20).

Preservação de culturas de fungos filamentosos: Método de Repicagem contínua

Figura 21. Fluxograma do método de repicagem contínua



Preservação de culturas de fungos filamentosos: Método de Castellani:

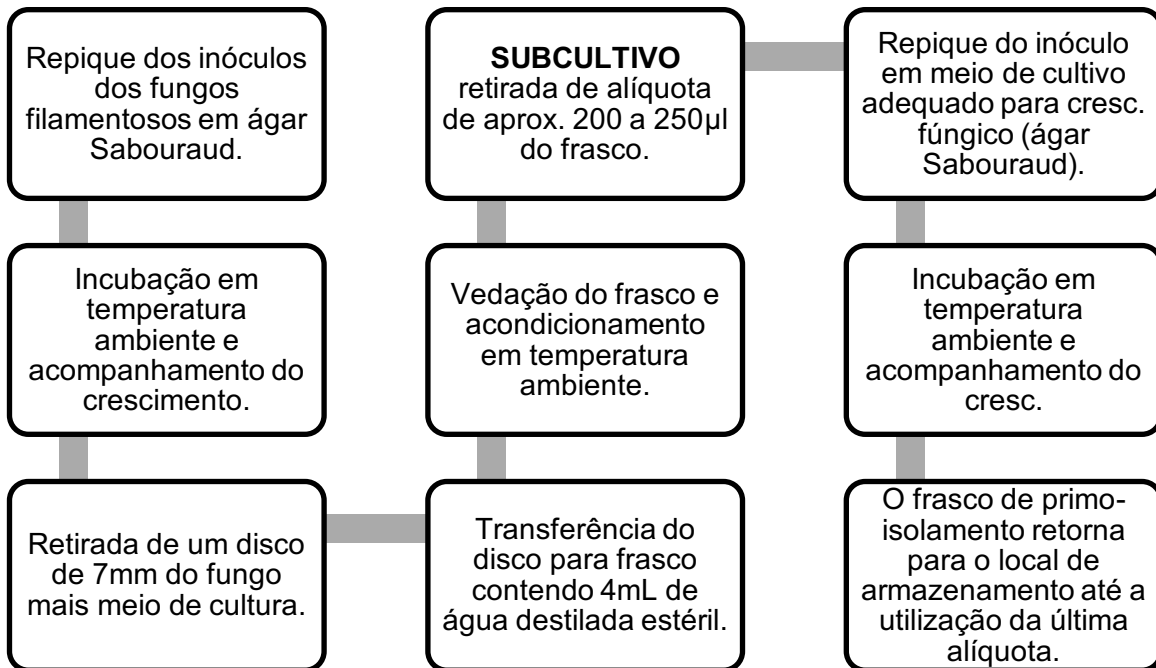
cada cultura de fungo filamentoso adquirida será repicada em ágar Sabouraud com cloranfenicol preparado em placa de Petri média (de capacidade aproximada de 25 a 30mL), contendo de 20mL a 25 mL de meio de cultura solidificado.

As placas de Petri serão incubadas em temperatura ambiente e após o crescimento, será retirado um pequeno disco de aproximadamente 7mm de fungo mais meio de cultura e transferido para frasco de vidro estéril contendo 4mL de água

destilada esterilizada. Os frascos serão tampados hermeticamente com tampa de borracha e cinta de alumínio.

O subcultivo das amostras de fungos, a partir do frasco com as culturas de primo-isolamento ocorrerá pela retirada de uma alíquota (200 a 250µL) da água destilada contendo a suspensão de esporos. Uma seringa de insulina pode auxiliar na retirada da alíquota que posteriormente será inoculada em meio de cultura adequado para crescimento fúngico como, por exemplo, o ágar Sabouraud. O frasco é vedado e volta para estocagem até a utilização da última alíquota. Não havendo contaminação da amostra ou perda da viabilidade celular, o frasco contendo o microrganismo ficará viável por 4 anos sendo utilizado duas alíquotas por semestre (fluxograma – figura 22).

Figura 22. Fluxograma do método de Castellani



Preservação de bacteriófagos: os fagos serão conservados em filtros de nitrato de celulose misturados em glicerol a 10% em temperatura de -20°C. Nesta temperatura a infectividade dos bacteriófagos é preservada por aproximadamente 2 meses.

4.4 Catálogo de imagens da FAMINAS-BH

O catálogo de imagens será confeccionado com base na proposta de aula das disciplinas de Microbiologia Básica, Microbiologia Clínica, Micologia, Virologia e Controle de Qualidade Microbiológico. Utilizando imagens próprias, produzidas no laboratório de Microbiologia da FAMINAS-BH, simultaneamente à montagem da biblioteca de micro-organismos. O quadro 9 apresenta como o catálogo será organizado.

Quadro 9. Catálogo da FAMINAS-BH

Microrganismo	Recursos explorados	Objetivo
<i>S. aureus</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, cocos agrupados em cachos de coloração roxa (cocos Gram-positivos).
	Semeadura em ágar hipertônico manitol	Demonstrar a fermentação do manitol e conseqüentemente a acidificação e mudança na coloração do meio. Comparando com a outra metade da placa de Petri sem a fermentação do manitol.
	Teste da Coagulase	Mostrar a formação do coágulo em tubo de ensaio contendo plasma de coelho. O <i>S. aureus</i> possui a enzima coagulase, o que o diferencia das outras espécies de estafilococos.
	Teste da Catalase	Demonstrar um teste catalase positivo e um teste catalase negativo. Os <i>Staphylococcus sp.</i> possuem uma enzima denominada catalase. Essa enzima é capaz de degradar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Desta forma, o teste permite diferenciar estafilococos de estreptococos que são catalase negativo.
<i>S. agalactiae</i>	Semeadura em ágar sangue	Demonstrar o padrão de hemólise em ágar sangue. O <i>S. agalactiae</i> produz uma lise total (β hemólise) formando halos transparentes e luminosos ao redor da colônia.
<i>S. pneumoniae</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, diplococos Gram-

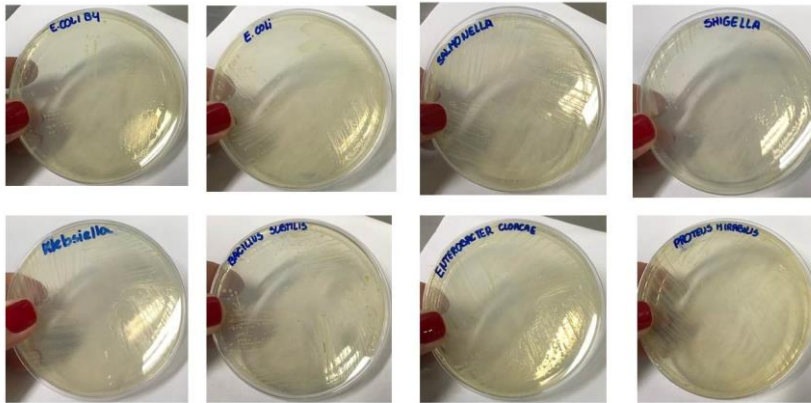
		positivos. Comparar morfologia do <i>S. pyogenes</i> com <i>S. pneumoniae</i> .
	Semeadura em ágar sangue	Demonstrar o padrão de hemólise em ágar sangue. O <i>S. pneumoniae</i> produz uma lise parcial (α hemólise) formando colorações verdes ao redor da colônia.
<i>S. pyogenes</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, cocos Gram-positivos agrupados em cadeia. Comparar a morfologia do <i>S. pyogenes</i> com <i>S. pneumoniae</i> .
	Semeadura em ágar sangue	Demonstrar o padrão de hemólise em ágar sangue. O <i>S. pyogenes</i> produz uma lise total (β hemólise) formando halos transparentes e luminosos ao redor da colônia.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, cocos Gram-positivos em pares ou cadeias curtas.
	Semeadura em ágar sangue	Demonstrar o padrão de hemólise em ágar sangue. Não produzem hemólise. Ocasionalmente são α hemolíticos.
	Ágar cromogênico VRE	Mostrar as colônias de <i>E. faecalis</i> resistentes à vancomicina na cor azul turquesa devido à clivagem da substância cromogênica do meio por enzimas produzidas pela espécie.
	Ágar MTS (Meio de Tolerância ao Sal)	Demonstrar a capacidade do gênero <i>Enterococcus</i> de crescer em um meio com elevada concentração de NaCl, ao contrário do gênero <i>Streptococcus</i> .
<i>Bacillus subtilis</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, bastonetes Gram-positivos.
	Semeadura em Ágar sangue	Mostrar a superfície das colônias secas e enrugadas de cor esverdeada ou acastanhada.
<i>Escherichia coli</i>	Coloração de Gram	Demonstrar a morfologia celular, ou seja, bastonetes Gram-negativos.
	Semeadura em Ágar Eosin Methylene Blue – EMB	Mostrar as características macroscópicas das colônias e do meio quando ocorre a fermentação rápida da lactose.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Semeadura em Ágar Eosin Methylene Blue - EMB	Mostrar as características macroscópicas das colônias e do

		meio quando ocorre a fermentação rápida da lactose. Comparar com <i>Escherichia coli</i> inoculado na outra metade da placa de petri.
<i>Proteus mirabilis</i>	Semeadura em ágar CLED	Mostrar as características macroscópicas das colônias e a inibição parcial ou total do “véu”.
	Semeadura em ágar sangue	Mostrar a formação do “véu” resultante da motilidade da bactéria em meio sólido.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coloração de Gram	Mostrar a presença de cápsula.
	Semeadura em Ágar CLED	Mostrar a característica das colônias (colônias amarelas) neste meio, devido à fermentação da lactose.
	Semeadura em Ágar MacConkey	Mostrar a característica das colônias (colônias rosa/vermelha) neste meio, devido à fermentação da lactose.
<i>Salmonella sp.</i>	Semeadura em Ágar MacConkey	Mostrar a característica das colônias (colônias incolores ou beges) neste meio, devido a não fermentação da lactose.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coloração de Gram	Mostrar a presença de cápsula.
	Semeadura em Ágar CLED	Mostrar a característica das colônias (azul translúcido) neste meio, devido a não fermentação da lactose.
<i>Cândida albicans, Cândida krusei e Cândida tropicalis</i>	Semeadura em Chomagar	Mostrar a característica das colônias de cada espécie semeada neste meio.
<i>Aspergillus sp.</i>	Semeadura em ágar Sabouraud	Mostrar as características macroscópicas das colônias.
<i>Cladosporium sp.</i>	Semeadura em ágar Sabouraud	Mostrar as características macroscópicas das colônias.
<i>Curvularia sp.</i>	Semeadura em ágar Sabouraud	Mostrar as características macroscópicas das colônias.
<i>Penicillium sp.</i>	Semeadura em ágar Sabouraud	Mostrar as características macroscópicas das colônias.
<i>Rhizopus sp.</i>	Semeadura em ágar Sabouraud	Mostrar as características macroscópicas das colônias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As primeiras amostras bacterianas (figura 23) foram provenientes do ICB sendo: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli B4*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sp.* e *Salmonella sp.*, essas foram inoculadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente na metodologia.

Figura 23. Placas de Petri contendo as primeiras amostras bacterianas



Legenda: Origem: ICB UFMG - Meio de cultura: ágar nutriente

Entretanto, após o período de incubação de 24 a 48 horas, observou-se a contaminação das culturas. Desta forma, os tubos de ensaio contendo ágar nutriente e BHI foram descartados, assim como as placas de Petri contendo o inóculo primário.

Nas placas de Petri e tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud e os inóculos dos seguintes fungos filamentosos: *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Curvularia sp.* e *Rhizopus sp.*; e fungos leveduriformes: *Cândida albicans*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorulla sp.*, a contaminação também ocorreu e as culturas fúgicas assim como os tubos de ensaio contendo o inóculo primário (figura 24) foram descartados.

Figura 25. Amostra da bactéria *Streptococcus sp.* em incubação



Legenda: Origem ICB UFMG – Meio de Cultura: ágar Sangue

Já as demais bactérias foram novamente repicadas de acordo com o procedimento pré-estabelecido, porém, nesta etapa utilizou-se para o repique alças calibradas descartáveis estéreis de 10 μ L e não a alça de platina, uma vez que acredita-se que a utilização da alça de platina ocasionou a contaminação das primeiras culturas.

Ademais, o procedimento de transferência dos micro-organismos foi realizado em cabine de segurança biológica e não próximo da chama do bico de Bunsen (como realizado com as primeiras culturas).

Após o período de incubação e crescimento dos micro-organismos, os tubos de ensaio contendo ágar nutriente foram armazenados em geladeira e os tubos contendo o caldo BHI foram utilizados no preparo dos microtubos para congelamento (figura 26).

Figura 26. Microtubos para congelamento



Em relação aos conjuntos das leveduras, no dia 26/08 o ICB disponibilizou apenas a *Cândida albicans*, por questões de logística e viabilidade internas. A *Cândida albicans* foi novamente repicada de acordo com o procedimento pré-estabelecido e, passado o período de incubação e crescimento do microrganismo, os tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud foram armazenados em geladeira e os tubos contendo o caldo BHI foram utilizados no preparo dos microtubos para congelamento (imagem abaixo).

Figura 27. Microtubos com leveduras para congelamento



Os fungos filamentosos (*Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Curvularia sp.* e *Rhizopus sp.*) foram semeados em tubos de ensaio e em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. Ambos foram deixados em incubação na temperatura ambiente (figura 28), pois o laboratório não possui incubadora B.O.D. Após o crescimento, os tubos de ensaio foram armazenados em geladeira e as placas foram utilizadas para o método de Castellani (figura 29).

Figura 28. Placas de Petri e tubos contendo fungos filamentosos em incubação

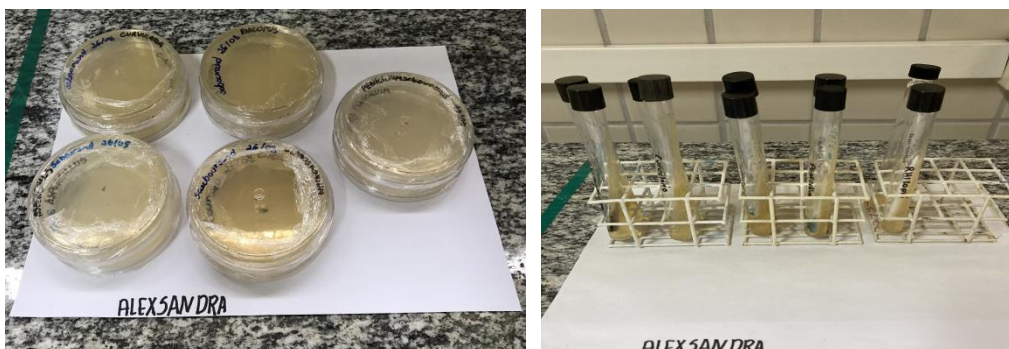


Figura 29. Frascos contendo amostras de fungos filamentosos (método de Castellani)



No que se refere às bactérias obtidas por doação do Instituto Hermes Pardini, estas foram enviadas no dia 21/10/2021, e são elas: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Foram doadas também amostras da levedura *Cândida krusei* e *Cândida tropicalis*. Todas as amostras bacterianas e leveduriformes foram enviadas em placa contendo ágar sangue.

As bactérias do gênero *Streptococcus* e a *P. aeruginosa* foram inoculadas apenas em caldo BHI, de acordo com o procedimento pré-estabelecido, não sendo inoculadas em tubo contendo ágar nutriente. Já *S. epidermidis* e *P. mirabilis*, foram inoculadas em tubo de ensaio contendo caldo BHI e tubo de ensaio com ágar nutriente inclinado.

Após o período de incubação e crescimento dos micro-organismos nos tubos de ensaio, os tubos contendo ágar nutriente foram armazenados em geladeira e os tubos contendo o caldo BHI foram utilizados no preparo dos microtubos para congelamento.

As leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud e em tubos de ensaio contendo ágar BHI, após o crescimento, os tubos contendo ágar Sabouraud foram armazenados em geladeira e os tubos contendo o caldo BHI foram utilizados no preparo dos microtubos para congelamento (figura 30).

Figura 30. Microtubos das amostras leveduriformes doadas pelo Instituto Hermes Pardini



O catálogo de imagens dos principais micro-organismos que compõem a biblioteca de micro-organismos da FAMINAS foi construído por meio de fotografias autorais à medida que os crescimentos das cepas obtidas foram observados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

O catálogo (ANEXO I) apresenta espécies bacterianas e fúngicas inseridas na biblioteca e apresenta características microscópicas, macroscópicas e bioquímicas apresentadas por imagens e textos construídos simultaneamente à construção da biblioteca microbiana. Esse compilado torna-se material didático da FAMINAS-BH e de toda rede educacional da Fundação Lael Varella Educação e Cultura, pois será disponibilizado digitalmente por link <https://qrco.de/catalogodemicrobiologia> e QR Code.

Figura 31. QR Code do catálogo



Catálogo de microbiologia

As coleções de culturas microbianas e seus respectivos catálogos são ferramentas que contribuem para a integração da comunidade científica, além do aprimoramento da qualidade das atividades didáticas no contexto das instituições de ensino, pois fornecem material microbiano que pode atuar em práticas que exploram competências, promovem o desenvolvimento científico e tecnológico e permitem o estudo dos micro-organismos de maneira prática e real (ABREU & TUTUNJI *et al.*,2004).

Outra importante vertente em relação à elaboração do catálogo simultaneamente a coleção é o fato de que publicitar o trabalho desenvolvido por meio de material didático, especialmente quando divulgado de maneira pública, além de divulgar resultados, permite a consulta ampla por novos cientistas, professores e estudantes e o conseqüente desenvolvimento de novos trabalhos a partir dos resultados obtidos neste estudo, e vai de encontro às metas da Convenção Brasileira sobre a diversidade Biológica (ABREU & TUTUNJI *et al.*,2004; BRASIL, 2000).

Durante o processo de construção da biblioteca de micro-organismos e do catálogo, especialmente nos momentos de: realização da transferência (repique) das amostras para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido e/ou sólido ou placas de Petri contendo meio de cultivo sólido, incubação dos tubos e placas, crescimento microbiano, preparo das amostras para congelamento e preparo das lâminas para coloração de Gram observou-se como é extremamente relevante o conhecimento teórico acompanhado do conhecimento prático.

Para Barbosa Ferreira e Barbosa, 2010, as atividades práticas em Microbiologia precisam ser fomentadas, pois são essenciais na compreensão, interpretação e assimilação dos conteúdos, permitindo que o aluno desenvolva a capacidade de observar, interpretar, inferir, formular hipóteses, fazer previsões e julgamentos críticos a partir da arguição dos dados (BARBOSA FERREIRA e BARBOSA, 2010).

Sant'ana (2018), aborda que dentre os conteúdos inseridos na grade curricular das disciplinas de Ciências e Biologia do Ensino Básico no Brasil, a Microbiologia está entre aqueles cujo qual o conteúdo oferece muitas possibilidades de relação com situações do cotidiano, uma vez que está diretamente ligado à saúde, alimentação e equilíbrio do meio ambiente. Contudo, tem sido abordada nas escolas por meio de metodologias pouco produtivas de ensino. É importante que o aluno experimente a Microbiologia, realize experimentos em laboratório, e tenha

acesso a estas ferramentas indispensáveis para assimilação da teoria (SANT'ANA, 2018).

Kimura e colaboradores (2013), também aborda que a disciplina de Microbiologia necessita de inovação dos conteúdos ministrados em sala de aula e ou laboratório, saindo do padrão que se é observado em muitas escolas, e partindo para uma proposta inovadora de ensino (KIMURA *et al.*, 2013). Pois, na abordagem meramente tradicional do conteúdo de Microbiologia, o aluno permanece passivo e os conteúdos trabalhados pelo professor muitas vezes não são absorvidos (WELKER, 2007).

Ameen, 2019, cita que é unânime entre qualquer pessoa que já tenha ensinado que um aluno aprende mais com uma abordagem prática do que simplesmente ouvindo. O autor aborda também a necessidade de alguns equipamentos básicos em um laboratório de microbiologia (microscópio, autoclave e incubadora), assim como uma biblioteca de micro-organismos e aumento dos conteúdos abordados em Micologia, inferindo que estes são limitados e com escassez de recursos didáticos (AMEEN, 2019).

NOEL e colaboradores (2020) reforçam que as atividades práticas na disciplina de Microbiologia são indispensáveis mesmo diante de outras ferramentas de ensino existentes e que tais habilidades essenciais práticas são fundamentais e esperadas pelos empregadores no mercado de trabalho (NOEL *et al.*, 2020).

A microbiologia se consolida como uma ciência dinâmica, transdisciplinar e diversa que estuda as interações microbianas com outros seres vivos e, no contexto das ciências da saúde, o estudo de doenças infecciosas em suas diversas vertentes está associado ao ensino da microbiologia (CRUZ *et al.*, 2019). Neste contexto, diante dos resultados obtidos neste mestrado profissional, é importante refletir que as instituições de ensino são formadoras não só de recursos humanos, mas de cidadãos com a capacidade de pensamento crítico. Dessa forma, esses ambientes são espaços privilegiados para abordagens temáticas transversais e que perpassam diversos cursos, como a disciplina de microbiologia, o que torna indispensável desenvolver materiais técnicos. Nesse contexto, a biblioteca microbiana se efetiva como uma ferramenta substancial para a construção de aulas práticas e atividades de extensão que aproximem o estudante da realidade das suas futuras possíveis áreas de atuação (Borges & Lima, 2007; CRUZ *et al.*, 2019).

A pandemia de COVID-19 trouxe consigo a necessidade do ensino remoto emergencial. Com isso, a grande preocupação dos professores de microbiologia é a

incapacidade de oferecer aos discentes uma experiência típica do laboratório presencial (NOEL *et al.*, 2020). O desenvolvimento de aulas práticas para alunos do ciclo profissionalizante da saúde para o ensino remoto foi realmente um grande desafio. Dentro desse contexto, ressaltam-se a importância do catálogo criado e a biblioteca de micro-organismos gerada por este estudo. Assim, esse trabalho e os seus frutos poderão contribuir tanto para o ensino presencial quanto para o ensino remoto em futuras adversidades sanitárias que possamos enfrentar.

6. CONCLUSÃO

A biblioteca de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), assim como o catálogo contendo imagens e textos sobre os principais micro-organismos que compõem esta biblioteca serão uma importante ferramenta na FAMINAS e auxiliarão na promoção do aprendizado teórico prático de qualidade na microbiologia no contexto dos cursos de Nutrição, Odontologia, Medicina, Biomedicina, Farmácia e Enfermagem, e futuramente em novos cursos da vertente das ciências biológicas e da saúde que venham a ser ofertados nesta instituição.

Estes materiais também são importantes para o desenvolvimento de pesquisa e extensão, e este resultado reforça a importância do mestrado profissional nas inovações tecnológicas e científicas nas instituições. E por fim, é possível concluir que a educação em microbiologia requer especificidades técnicas e para ser realizado com alto padrão de qualidade é indispensável a construção de uma biblioteca microbiana, de acordo com a infraestrutura e demanda da instituição, mas deve constar nos laboratórios didáticos das instituições de ensino superior que apresentam a Microbiologia na grade curricular dos seus cursos das áreas da saúde e biológicas.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho ampliam as possibilidades de investimento em materiais didáticos teóricos e práticos na FAMINAS-BH e demais instituições de ensino e pesquisa da Fundação Lael Varella Educação e Cultura, não só restritos a microbiologia, mas que podem abranger outras áreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M. V. e TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 2, p. 236-251, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. Brasília, 2004.
- ALTERTHUM, F. Nutrição e Metabolismo Bacterianos. *In*: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª edição, São Paulo: Atheneu, 2015.
- AMEEN, F. Teaching Methods for Microbiology in Saudi Arabia. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 47, n. 2, p. 175-178, 2019.
- BARBOSA, F. H. F. e BARBOSA, L. P. J. L. Alternativas Metodológicas em Microbiologia – Viabilizando Atividades Práticas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 2, 2010.
- BLACK, J. G. e BLACK, J. L. Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5,1 million the species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438, 2011.
- BELOTI, I. F. Viabilidade de Fungos Necrotróficos Sob Diferentes Métodos de Preservação. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.
- BORGES, R. M. R. e LIMA, V. M. R. Tendências Contemporâneas do Ensino de Biologia no Brasil. *Revista Eletrônica de Enseñanza de las Ciencias*, v. 6, p. 165-175, 2007.
- BROCKMAN, R. M. *et al.* Student perceptions of online and in-person microbiology laboratory experiences in undergraduate medical education. **Medical education online**, v. 25, n.1, 2020.
- BROOKS, G. F. *et al.* Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Aldeberg. 26ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2014.
- CASTRO, C. H. *et al.*, Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 3, p. 143-156, 2020.
- COSTA, E. C. *et al.*, Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, v. 19, p. 111-122, 2009.
- CONDIT, R. C. Principles of Virology. *In*: KNIFE, D. M e HOWLEY, P. M. **FIELDS VIROLOGY**. 6ª edição, Philadelphia: Market Street, 2001.

CRUZ, K. P. *et al.*, Microbiologia no cotidiano: proposta de ensino por investigação de baixo custo. *Atas de Ciências da Saúde*, v. 7, p. 82-100, 2019.

DELLARETTI, E. M. Preservação de Fungos em Baixas Temperaturas. Universidade Federal de São João Del-Rei, 2014.

DIOGO, H. C. *et al.*, Preservação de Fungos em Água Destilada. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, p. 591-594, 2005. Disponível em: <Preservação de fungos em água destilada.pdf> Acesso em: 20 abr. 2021.

ENGELKIRK, P. G. e DUBEN – ENGELKIRK, J. Burton Microbiologia para as Ciências da Saúde. 9ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

FRAMIL, V. M. S. Técnicas Laboratoriais Utilizadas em Micologia Médica. *In: ZAITZ, C. et al. Compêndio de Micologia Médica*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

FRANÇA, F. S. e LEITE, S. B. Micologia e Virologia. 1ª edição, Porto Alegre: Sagah, 2018.

FERREIRA, Davis Fernandes. Propriedades Gerais dos Vírus. *In: SANTOS, Norma Suely de Oliveira et al. Virologia Humana*. 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 27-31.

GAMBALE, W. Morfologia, Reprodução e Taxonomia dos fungos. *In: ZAITZ, C. et al. Compêndio de Micologia Médica*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

GEMELLI, T. *et al.*, **Manual Prático de Microbiologia Clínica: Texto e Atlas Colorido de Bacteriologia**. Rio Grande do Sul: UNISINOS, 2020.

GIRÃO, M. D. *et al.*, Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 229-233, 2004.

HARISON, S. C. Principles of Virus Structure. *In: KNIPE, D. M e HOWLEY, P. M. FIELDS VIROLOGY*. 6ª edição, Philadelphia: Market Street, 2001.

HOLANDA, C. M. C. X. *et al.*, Manual de Bacteriologia e Enteroparasitos. Rio Grande do Norte: EDUFRN, 2017.

JACOBUCCI, D. F. C. e JACOBUCCI, G. B. Abrindo o tubo de ensaio: o que sabemos sobre as pesquisas em Divulgação Científica e Ensino de Microbiologia no Brasil? **Journal of Science Communication**, 2009. Disponível em: <ensino em Micro I.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2021.

KIMURA, Angela Hitomi *et al.* Microbiologia Para o Ensino Médio e Técnico: Contribuição da Extensão ao Ensino e Aplicação da Ciência. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 1-14, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/al%C3%AA/Downloads/trab%20de%20hist/5516-18923- 1-PB.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2021.

- LEVINSON, W. Microbiologia Médica e Imunologia. 13ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2016.
- LODISH, H. *et al.* Molecular Cell Biology. 4ª edição, Nova Iorque: WH Freeman, 2000.
- MADIGAN, M. T. *et al.* Microbiologia de Brock. 12ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MEZZARI, A. e FUENTEFRIA, A. M. Micologia no Laboratório Clínico. 1ª edição, Barueri: Manole, 2012.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram.** Brasília, 2001.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **A Convenção Sobre Diversidade Biológica.** Brasília, 2000.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- NOEL, T. C. *et al.*, Keeping the microbiology lab alive: essential microbiology lab skill development in the wake of COVID-19. **Can J Microbiol**, p. 603-604, 2020.
- PASSADOR, M. M. *et al.* Manutenção da Viabilidade e Patogenicidade de Culturas Mantidas na Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, v. 72, p. 51-55, 2010.
- PROCOP, E. *et al.* Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- QUINN, P. J. *et al.* Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- REIS, A. A. S e SANTOS, R. S. Microbiologia Básica. 1ª edição, Aparecida de Goiânia, Faculdade Alfredo Nasser, 2016.
- ROMEIRO, R. S. Preservação de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- RYU, W-S. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. 1ª edição, Seoul: Elsevier, 2017.
- SANTOS, E. R. D. Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos. Florianópolis, 2015.
- SILVA, P. C. *et al.* Métodos de conservação para cepas bacterianas. 2015. Disponível em: <45-Texto do artigo-170-1-10-20160413.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2021.
- SILVA, J. O. *et al.* Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 73-74, 2008.

SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de Micro-organismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, 2012.

TORRES, B. K. **Viabilidade e Caracterização Fisiológica de Fungos Preservados em Água Destilada Esterilizada na Micoteca URM**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 16, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2017.

WELKER, C. A. D. O Estudo de Bactérias e Protista no Ensino Médio: Uma abordagem menos convencional. **Experiência em Ensino de Ciências**, v. 2, p. 69-75, 2007.

YOKOMIZO, C. H. *et al.*, **Bacteriologia Clínica**. Porto Alegre: SAGAH, 2019.



Catálogo

de microbiologia

Alexsandra L. P. Resende

SETOR DE LABORATÓRIOS
Faminas-BH e Faminas-Muriaé

Sumário



Apresentação	3
Uma breve história	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
Fluxograma de identificação de <i>Staphylococcus</i>	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	12
<i>Bacillus subtilis</i>	13
<i>Escherichia coli</i>	14
<i>Enterobacter sp.</i>	15
<i>Proteus sp.</i>	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
<i>Salmonella sp.</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i>	20
<i>Aspergillus sp.</i>	21
<i>Cladosporium sp.</i>	22
<i>Curvularia sp.</i>	23
<i>Penicillium sp.</i>	24
<i>Rhizopus sp.</i>	25
Vírus	26

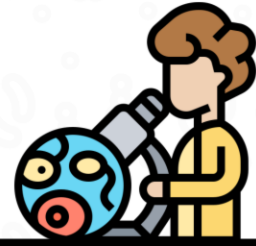
Apresentação

Este catálogo faz parte dos resultados de um projeto de Mestrado Profissional da autora - Alexandra L. P. Resende -, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Torna-se público este compilado microbiológico, para ajudar os alunos dos cursos da área da saúde da FAMINAS, como material complementar em seus estudos. Boa leitura!



Uma breve história...



O estudo da Microbiologia teve início a mais de 300 anos quando Anton Van Leeuwenhoek descobriu a existência dos microrganismos enquanto observava amostras de água da chuva através de um microscópio desenvolvido por ele.



A partir daí, a curiosidade e o interesse dos pesquisadores pelo mundo microbiano resultou em inúmeras descobertas relevantes que levaram ao estabelecimento da Microbiologia como uma ciência (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A ciência microbiológica estuda os organismos microscópicos, suas atividades biológicas, suas relações intraespecíficas, interespecíficas e com o meio ambiente. O grupo dos microrganismos inclui as algas microscópicas, os protozoários, os fungos (leveduras e bolores), as bactérias e os vírus (REIS e SANTOS, 2016; KIMURA et al., 2013).

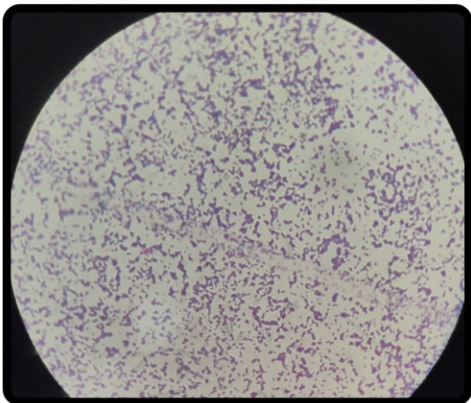
Nossa biblioteca de microrganismos

Conheça por meio deste catálogo características de alguns desses microrganismos (bactérias, fungos e vírus) da biblioteca de microrganismos que está sendo construída no laboratório da FAMINAS-BH. Este catálogo contém características e imagens dos principais micróbios que já compõem a biblioteca.

Staphylococcus aureus

O nome do gênero **Staphylococcus** se refere ao fato de que eles crescem em um padrão que se assemelha a um cacho de uvas. Já o nome da espécie **aureus (amarelo ou dourado)** se refere ao fato de que as colônias podem apresentar uma coloração amarelo-ouro.

Essas bactérias estão presentes na pele e nas membranas mucosas dos seres humanos, ou seja, fazem parte da microbiota normal do indivíduo.

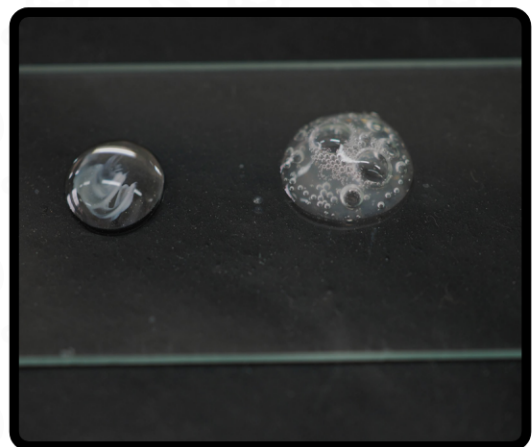


Reação à coloração de Gram

A coloração de Gram divide as bactérias em dois grupos principais: Gram-positivas e Gram-negativas. Os *S. aureus* apresentam-se como cocos agrupados em cachos (arranjos em grumos), de coloração roxa, ou seja, **Gram-positivos**. Já as bactérias que apresentam coloração rosa quando coradas pelo Gram, são chamadas de **Gram-negativas**.

Teste da catalase

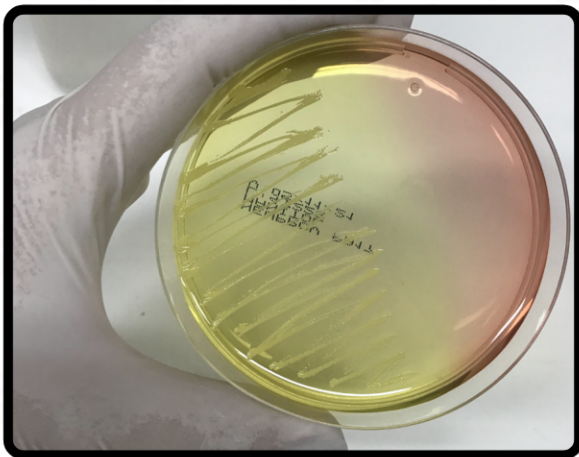
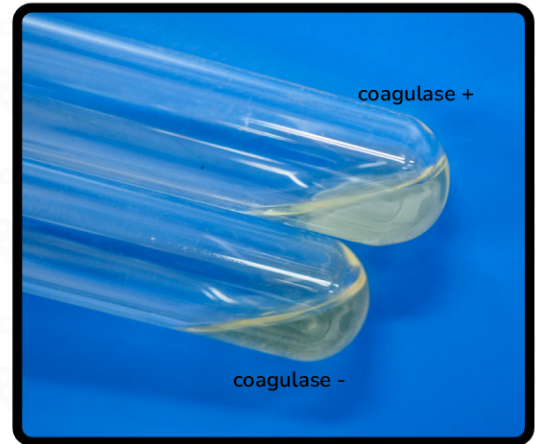
A determinação da presença ou ausência da enzima catalase é muito importante na identificação do gênero, ou seja, os *Staphylococcus sp.* são catalase positivos, ao contrário dos *Streptococcus sp.* que são catalase negativos. Desta forma, quando uma gota de peróxido de hidrogênio é colocada sobre uma colônia bacteriana produtora de catalase ocorre a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio gasoso e água.



Staphylococcus aureus

Teste da coagulase

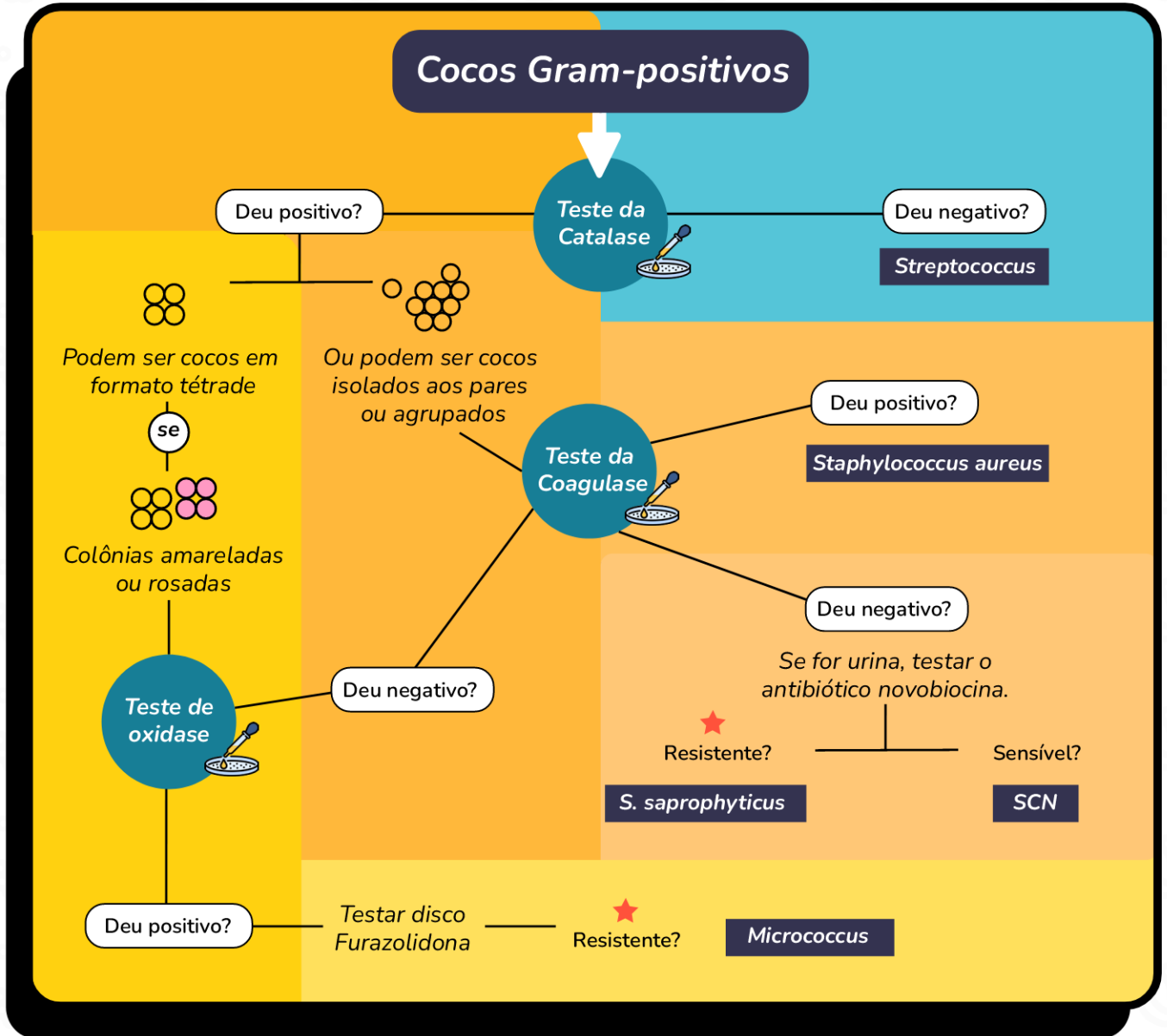
Já a determinação da presença ou ausência da coagulase é muito importante na identificação da espécie, ou seja, o *S. aureus* produz a enzima coagulase ao contrário de outras espécies coagulase-negativas. Desta forma, quando uma colônia de *S. aureus* é suspensa em plasma, a coagulase se liga a um fator sérico, e ocorre a conversão do fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo.



Ágar sal manitol

S. aureus é capaz de crescer na presença de elevada concentração de sal. Sendo assim, o ágar sal manitol (meio de cultura seletivo) é utilizado no isolamento de *S. aureus*, que ao fermentar o manitol promove a acidificação e a mudança de coloração do meio (de vermelho/rosado para amarelo).

Fluxograma de identificação de *Staphylococcus*



Streptococcus agalactiae

O nome do gênero **Streptococcus** refere-se à aparência longa e flexível da cadeia. Já o nome da espécie **agalactiae** (*agalactia*) que significa leite, faz referência ao primeiro isolado denominado de *Streptococcus mastitidis* responsável por causar mastite bovina.

S. agalactiae podem colonizar a pele, cavidade oral, o trato respiratório superior e o trato geniturinário dos indivíduos.

Padrão de hemólise em ágar sangue

O *S. agalactiae* quando inoculado em ágar sangue, produz uma lise total (β - hemólise), formando halos transparentes e luminosos ao redor da colônia.



Streptococcus pneumoniae

O nome da espécie ***pneumoniae*** refere-se à *pneumon* (pulmões) uma vez que a bactéria causa pneumonia. O *Streptococcus pneumoniae* é um microrganismo comum na orofaringe e nasofaringe de adultos e crianças.

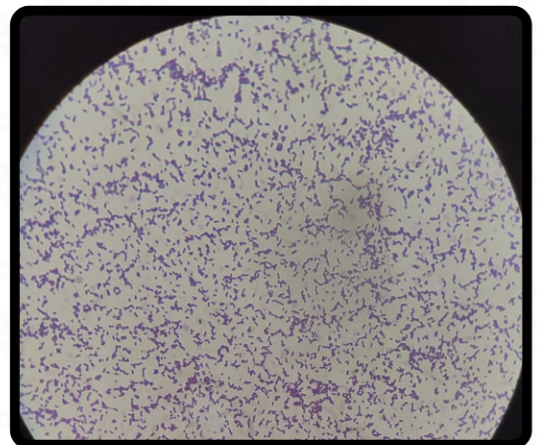


Padrão de hemólise em ágar sangue

A bactéria *S. pneumoniae* quando inoculada em ágar sangue, produz uma lise parcial, ou seja, uma alfa hemólise, formando uma coloração verde ao redor das colônias.

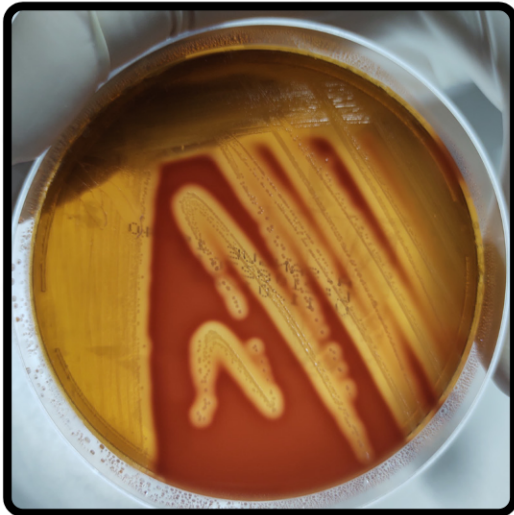
Coloração de Gram

Os *S. pneumoniae* quando corados pela técnica de coloração de Gram, apresentam-se como cocos aos pares (diplococos) ou em cadeias curtas corados em roxo (Gram-positivos).



Streptococcus pyogenes

O nome da espécie **pyogenes** faz referência à formação de pus nas feridas associadas à infecção por *S. pyogenes*. Colonizam o trato respiratório superior e a superfície da pele dos seres humanos.

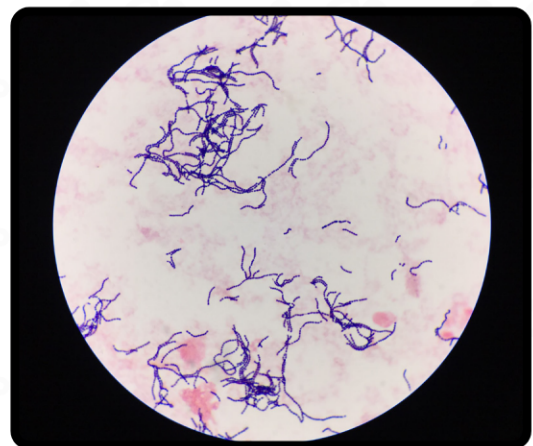


Padrão de hemólise em ágar sangue

O *S. pyogenes* quando inoculado em ágar sangue, produz uma lise total (β -hemólise) formando halos transparentes e luminosos ao redor da colônia.

Coloração de Gram

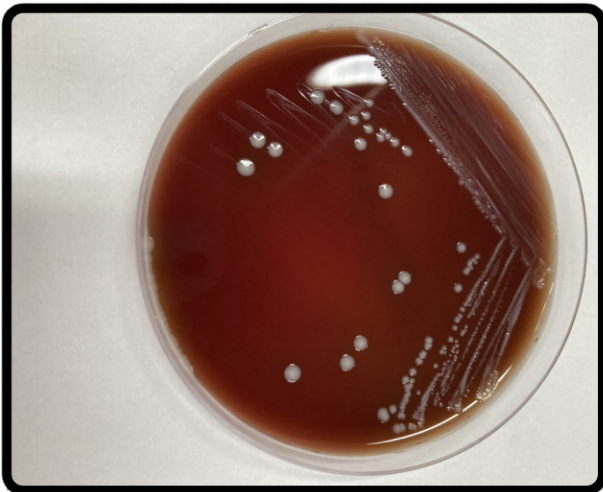
Os *S. pyogenes* quando corados pela técnica de coloração de Gram apresentam-se como cocos em cadeias e de coloração roxo, ou seja, Gram-positivos.



Enterococcus faecalis

O nome do gênero **Enterococcus** refere-se a cocos de intestino (*enteron* significa intestino) ou cocos entéricos. Já o nome da espécie **faecalis** é relativo a fezes, pois essa bactéria é comumente isolada de fezes humanas.

Os *Enterococcus faecalis* colonizam o trato gastrointestinal dos seres humanos e animais.

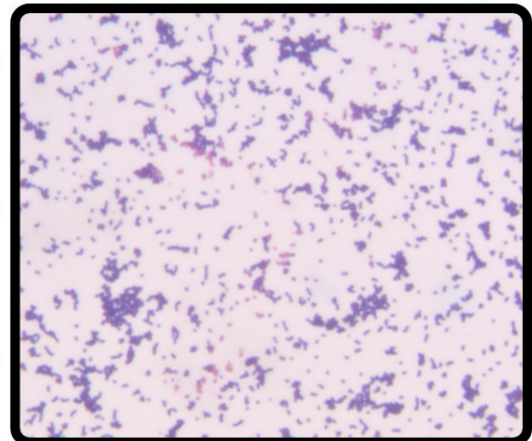


Padrão de hemólise em ágar sangue

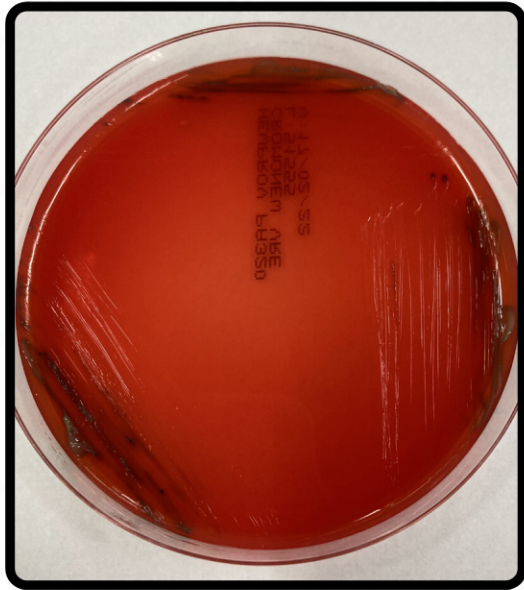
Após 24 horas de incubação em ágar sangue, os *Enterococcus faecalis* podem produzir γ -hemólise (ausência de hemólise), α -hemólise (hemólise parcial) ou raramente β -hemólise (hemólise total). Na imagem ao lado, observa-se ausência de hemólise.

Coloração de Gram

Quando corados pelo Gram apresentam-se como cocos Gram-positivos em pares ou cadeias curtas. Semelhantes morfológicamente ao *S. pneumoniae* (mostrado anteriormente).



Enterococcus faecalis



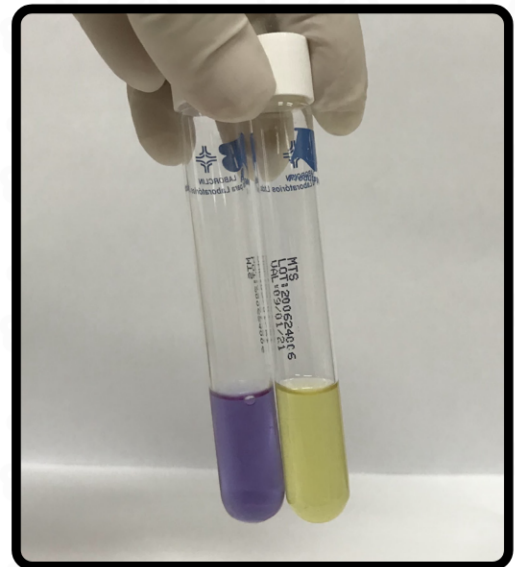
Ágar VRE Cromogênico

O Ágar VRE Cromogênico é um meio de cultura seletivo e diferencial para isolamento de *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina. Desta forma, as colônias de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina crescem na coloração azul. Já as colônias de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina crescem na coloração rosa.

Ágar MTS

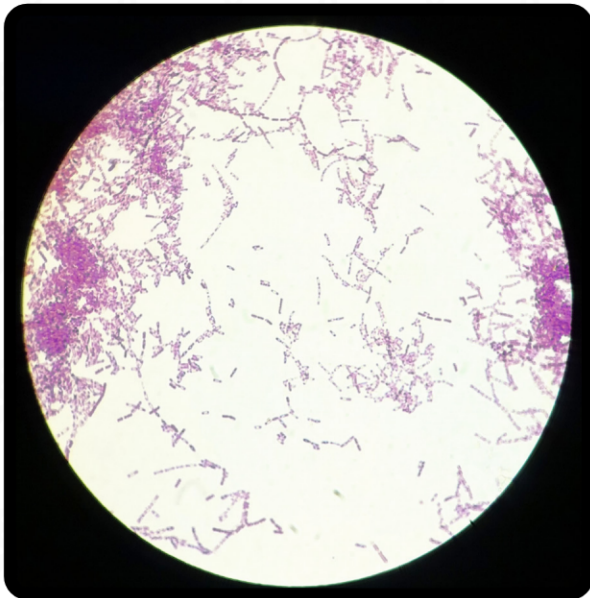
Meio de tolerância ao Sal

Os Enterococcus apresentam a capacidade de crescer em meio com NaCl a 6,5% ao contrário dos Streptococcus. Desta forma, o meio MTS (cor original roxo) é muito utilizado na diferenciação entre esses gêneros. A tolerância ao NaCl 6,5% pode ser observada pela turvação do meio e/ou mudança de cor do indicador. Tubo de cor roxa bactéria *S. pyogenes* e tubo na cor amarelo bactéria *E. faecalis*.



Bacillus subtilis

O nome do gênero **Bacillus** refere-se a pequeno bacilo (*bacillum*). Já a espécie **subtilis** faz referência à traços morfológicos da bactéria. Essa espécie ocorre naturalmente nos solos, colonizando as raízes das plantas.



Coloração de Gram

O *B. subtilis* quando corado pelo Gram apresenta-se como bastonetes Gram-positivos.

Crescimento em ágar sangue

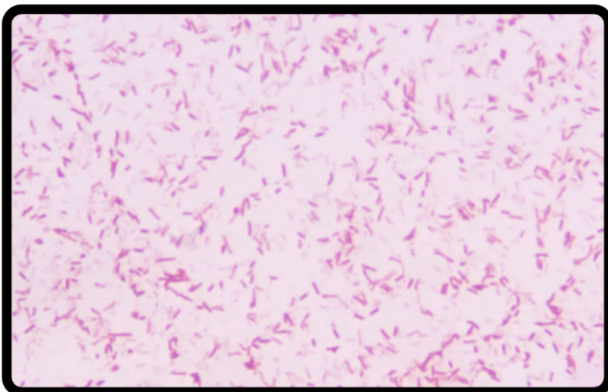
As colônias de *B. subtilis* em ágar sangue apresentam coloração esverdeada ou acastanhada e superfície seca e enrugadas.



Escherichia coli

O nome do gênero **Escherichia** é uma homenagem ao médico Theodor Escherich que identificou a bactéria em 1885. Já a espécie **coli** (kólon significa intestino grosso) faz referência à região colonizada pela bactéria.

A *E. coli* é um bastonete Gram-negativo presente no trato gastrointestinal dos seres humanos, além disso, pertencente à família *Enterobacteriaceae*.



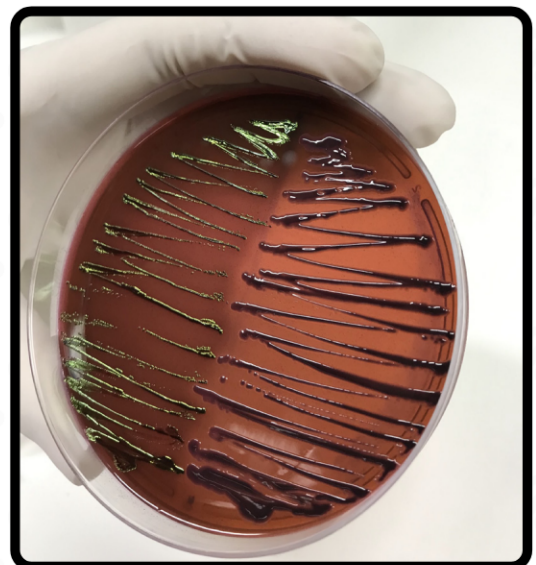
Coloração de Gram

As colônias da bactéria *E. coli* quando coradas pelo Gram apresentam-se como bastonetes Gram-negativos (como mostra a imagem ao lado).

Crescimento em ágar Eosin Methylene Blue - EMB

O ágar EMB apresenta baixa capacidade seletiva, contudo é muito utilizado na diferenciação de bactérias lactose-positivas de bactérias lactose-negativas.

A *E. coli* fermenta a lactose e quando crescida neste meio suas colônias apresentam-se violetas escuras e exibem um brilho verde metálico à luz refletida.



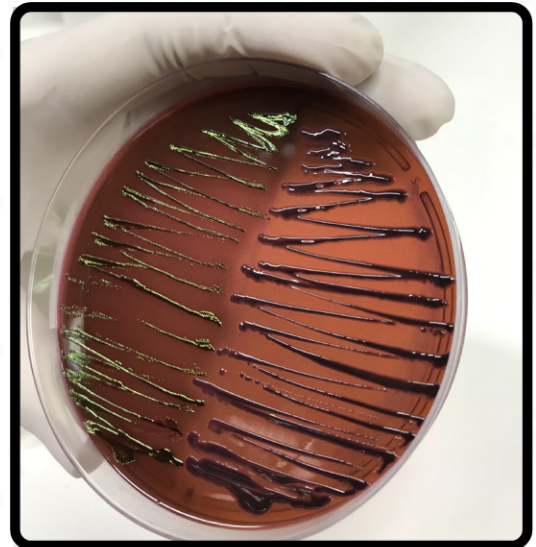
Enterobacter sp.

Bactéria presente na pele e no trato gastrointestinal dos indivíduos, pertencente à família *Enterobacteriaceae* assim como *E. coli*, *Proteus sp.* e *Klebsiella sp.*

Crescimento em ágar Eosin Methylene Blue - EMB

O gênero *Enterobacter* também fermenta rapidamente a lactose e suas colônias apresentam-se na cor violeta/rosa quando crescidas neste meio.

Na imagem, observa-se *E.coli* crescida em metade da placa (colônias exibindo um brilho verde metálico) e as colônias de *Enterobacter* na cor violeta.

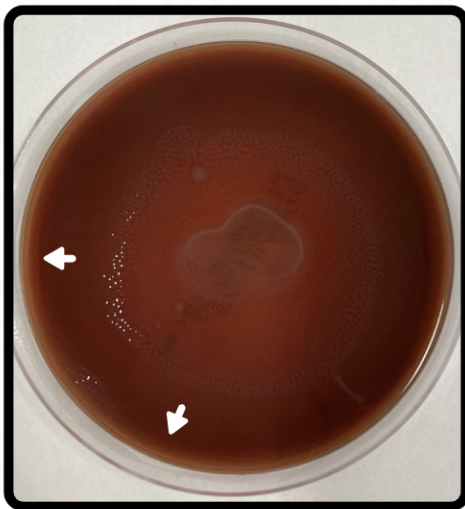


Proteus sp.

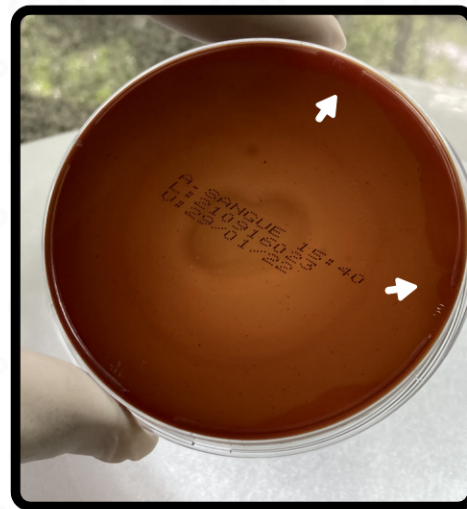
Bactéria da família *Enterobacteriaceae*, membro da microbiota normal do indivíduo (coloniza a pele e o trato gastrointestinal).

Crescimento em ágar sangue

Quando crescido neste meio de cultura é visível a formação do “véu” resultante da motilidade da bactéria.



Frente da placa

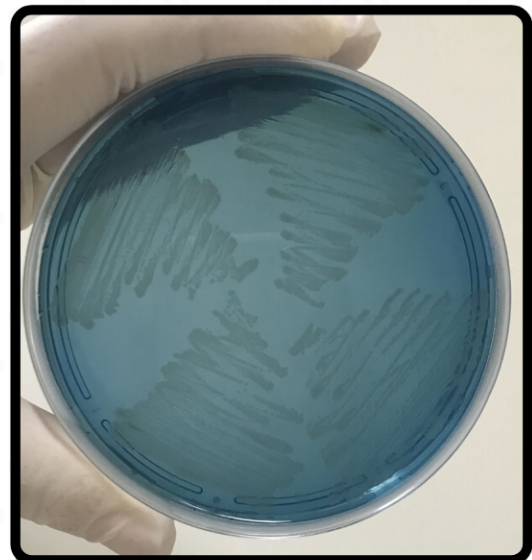


Fundo da placa

Crescimento em ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)

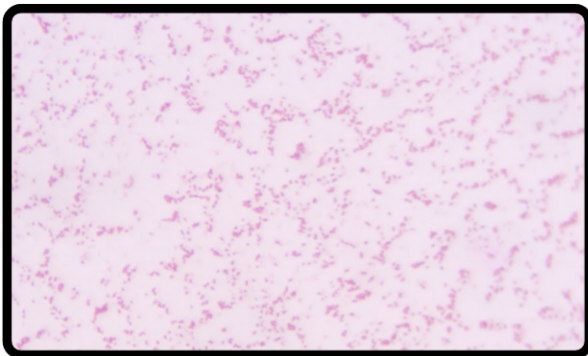
O ágar CLED é utilizado para o isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostra de urina. Este meio permite identificar bactérias lactose-positivas (colônias amarelas) de bactérias lactose-negativas (colônias verdes, azuis ou incolores).

A baixa concentração de eletrólitos do meio inibe total ou parcialmente a formação do véu de *Proteus* (como pode ser observado na imagem ao lado).



Klebsiella pneumoniae

Bactéria da família *Enterobacteriaceae*. *K pneumoniae* faz parte da microbiota normal do indivíduo (coloniza a pele e o trato gastrointestinal).



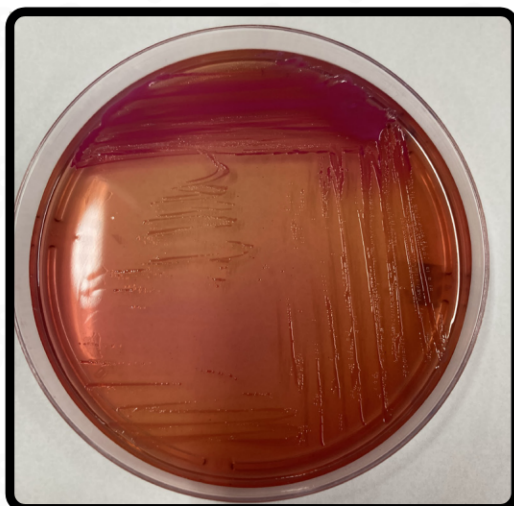
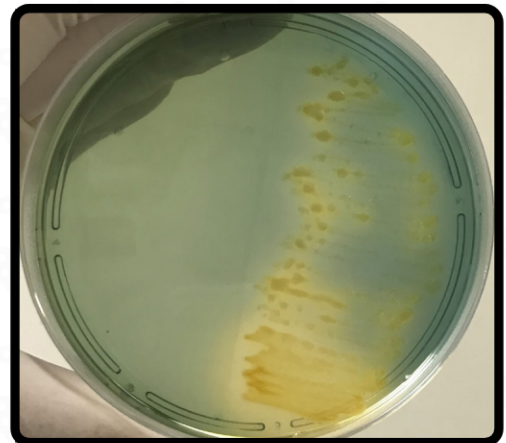
Coloração de Gram

Os membros do gênero têm uma cápsula proeminente que pode ser visualizada nesta lâmina corada pelo Gram (bastonetes Gram-negativos encapsulados).

Crescimento em ágar Cystine Lactose Eletrolyte Deficient (CLED)

K. pneumoniae quando crescida em ágar CLED apresenta-se como colônias mucóides e de cor amarela, devido à fermentação da lactose.

Bactérias lactose-positivas = colônias amarelas.
Bactérias lactose-negativas = colônias verdes, azuis ou incolores.



Crescimento em ágar MacConkey

O MacConkey é seletivo para bactérias Gram-negativas, ou seja, Gram-positivos têm o seu crescimento inibido devido à presença do cristal violeta e sais biliares. E é um meio diferencial para a fermentação da lactose.

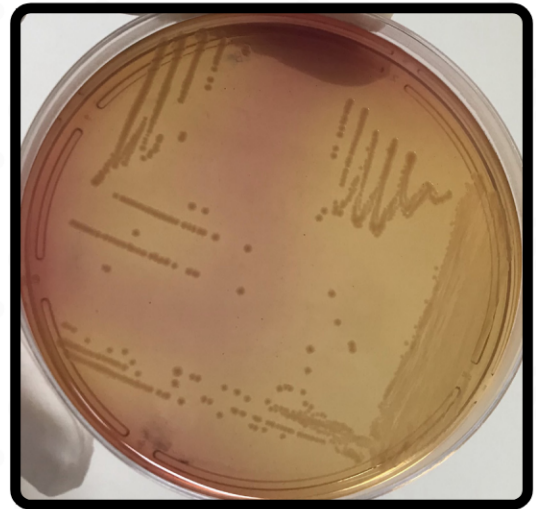
K. pneumoniae fermenta a lactose e, desta forma, suas colônias apresentam-se na coloração rosa/vermelha quando crescidas no MacConkey.

Salmonella sp.

Bactéria da família *Enterobacteriaceae*. Esta bactéria não faz parte da microbiota normal do indivíduo.

Crescimento em ágar ágar MacConkey

Essa bactéria é lactose-negativa, desta forma, as colônias de *Salmonella sp.* não apresentam coloração rosa/vermelha (como por exemplo, *K pneumoniae* na imagem acima), ou seja, são transparentes ou beges quando crescidas no MacConkey, devido a não fermentação da lactose.

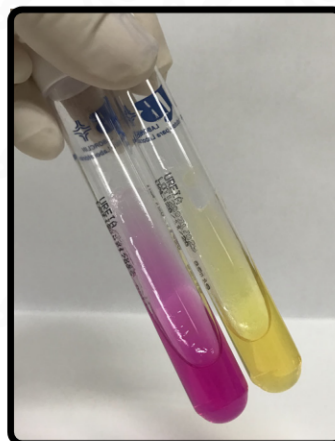


Conteúdo complementar

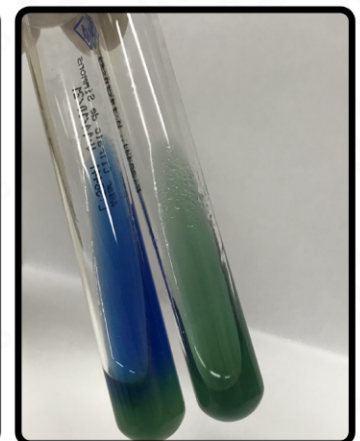
Várias provas bioquímicas podem ser usadas na identificação das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Na primeira imagem, tem-se o ágar base uréia (Ágar de Christensen) que diferencia bactérias produtoras da enzima uréase das não produtoras. Ex: *Proteus sp.* uréase + (mudança na cor original do meio amarelo para pink) e *E. coli* uréase -.

Já na segunda imagem, tem-se o ágar Citrato de Simmons que verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono. A mudança na cor original do meio (cor verde) indica que a bactéria utilizou o citrato como única fonte de carbono (ex: *Klebsiella sp.* resultado positivo e *E. coli* resultado negativo).



Ágar de Christensen



Ágar Citrato de Simmons

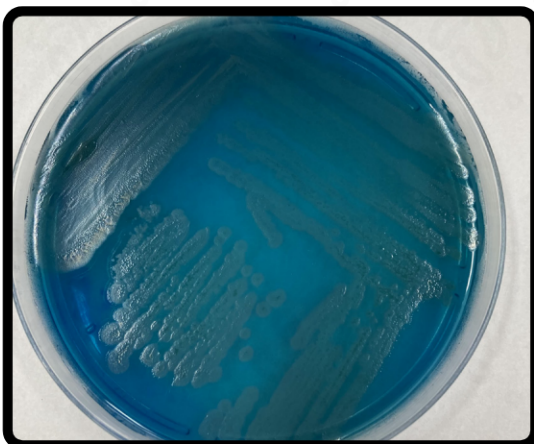
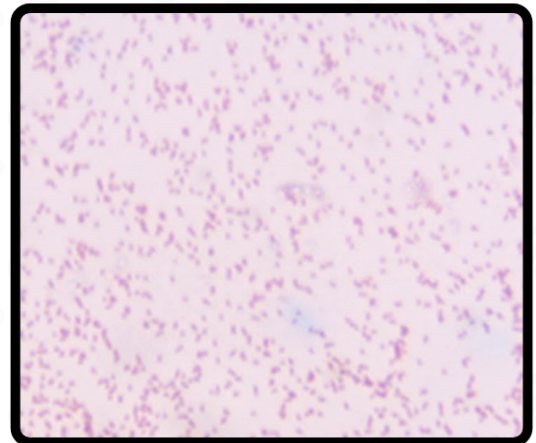
Pseudomonas aeruginosa

O nome do gênero *Pseudomonas* (*pseudes, falso; monas, unitário*) se refere ao arranjo celular observado na coloração de Gram, no qual os organismos em pares parecem com células únicas. Já o nome da espécie *aeruginosa* (cobre oxidado ou verde) se refere aos pigmentos azul e amarelo produzidos pela bactéria.

P. aeruginosa não faz parte da microbiota normal do indivíduo, colonizando-o transitoriamente.

Coloração de Gram

As colônias de *P. aeruginosa* quando coradas pelo Gram apresentam-se como bastonetes Gram-negativos pequenos, arranjados aos pares (como mostra a imagem ao lado).

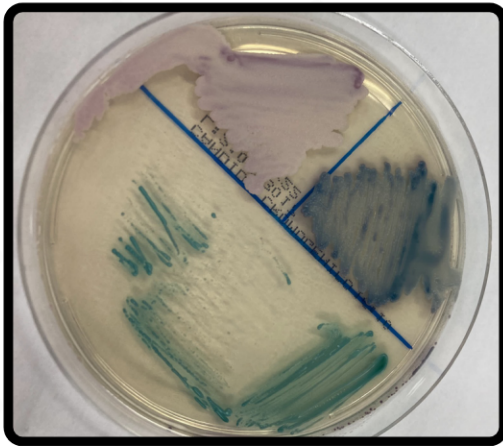


Crescimento em ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)

P. aeruginosa é lactose-negativa, sendo assim, suas colônias apresentam-se na coloração azul translúcida neste meio, devido a não fermentação da lactose.

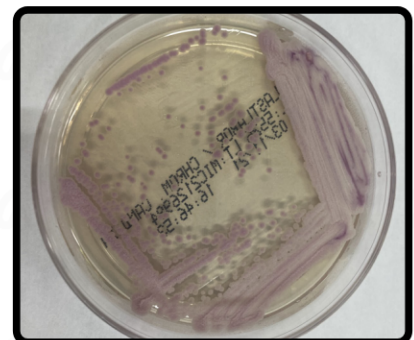
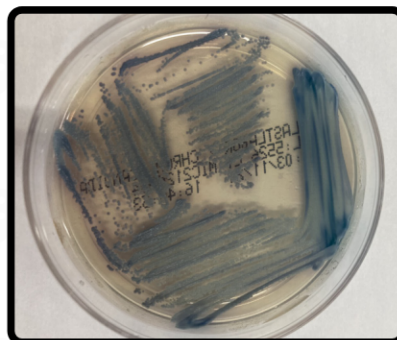
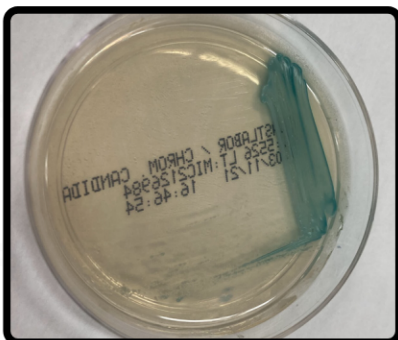
Cândida albicans, Cândida krusei e Cândida tropicalis

Fungos leveduriformes, unicelulares e formam colônias circulares, pastosas ou mucoides. A *Cândida sp.* faz parte da microbiota normal do indivíduo.



Crescimento em CHOMagar

O CHOMagar é um meio de isolamento e identificação de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Este meio possui substratos cromogênicos. Sendo assim, as colônias de *C. albicans* apresentam-se na cor verde claro a verde médio, as colônias de *C. krusei* aparecem na cor rosa claro, já *C. tropicalis* aparecem na cor azul esverdeado a azul metálico.



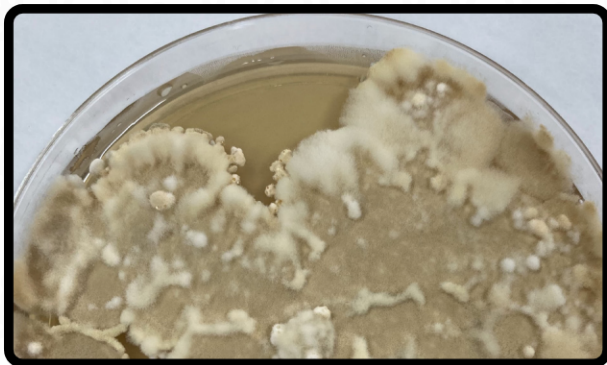
Aspergillus sp.

Fungo filamentosso, multicelular, apresenta micélio vegetativo (fixado no meio de cultivo) e reprodutivo (esporos).

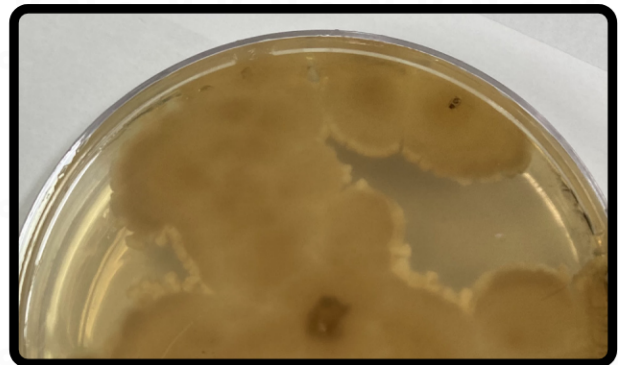
Aspergillus sp. é encontrado na natureza, matéria orgânica e detritos vegetais.

Crescimento em ágar Sabouraud

Características macroscópicas da colônia: filamentosso, pulverulento, que pode apresentar várias cores (preto, vermelho ou amarelo).



Frente da placa

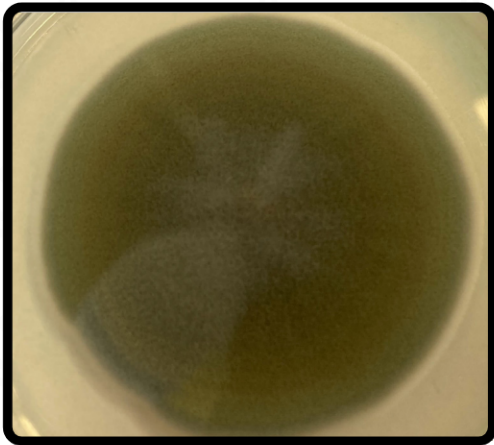


Fundo da placa

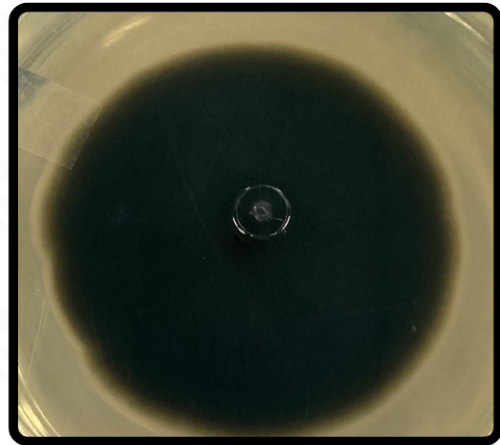
Cladosporium sp.

Fungo filamentosso, multicelular, apresenta micélio vegetativo (fixado no meio de cultivo) e reprodutivo (esporos).

Crescimento em ágar Sabouraud



Frente da placa

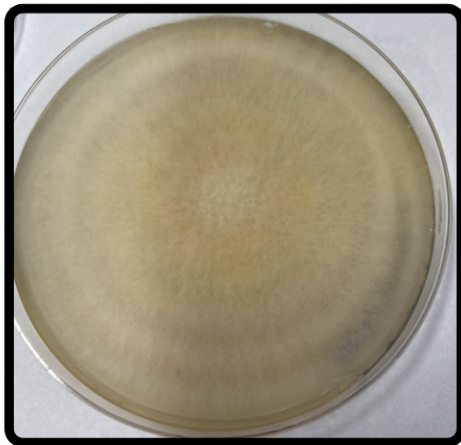


Fundo da placa

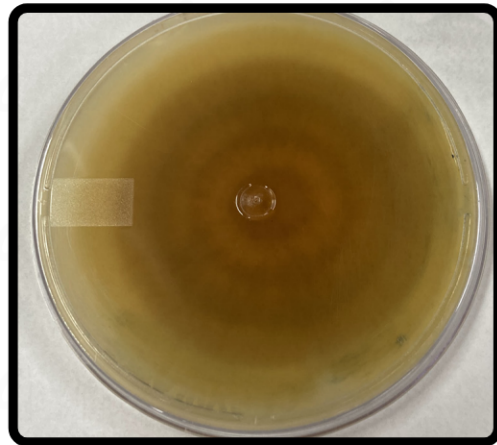
Curvularia sp.

Fungo filamentososo, multicelular, apresenta micélio vegetativo (fixado no meio de cultivo) e reprodutivo (esporos). *Curvularia sp.* é encontrado na natureza, matéria orgânica e detritos vegetais.

Crescimento em ágar Sabouraud



Frente da placa



Fundo da placa

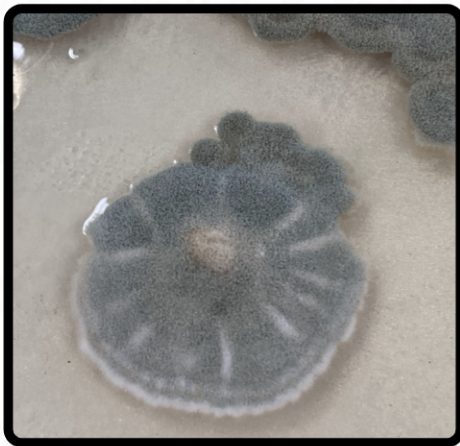
Penicillium sp.

Fungo filamentosso, multicelular, apresenta micélio vegetativo (fixado no meio de cultivo) e reprodutivo (esporos)

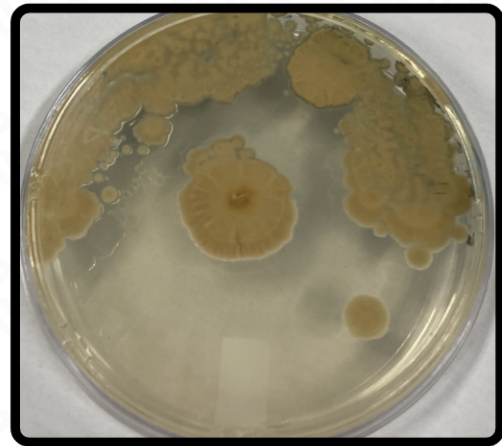
Penicillium sp. é encontrado na natureza, matéria orgânica e detritos vegetais.

Crescimento em ágar Sabouraud

Características macroscópicas da colônia: filamentosso aveludado, inicialmente branco, mas passando para esverdeado.



Frente da placa



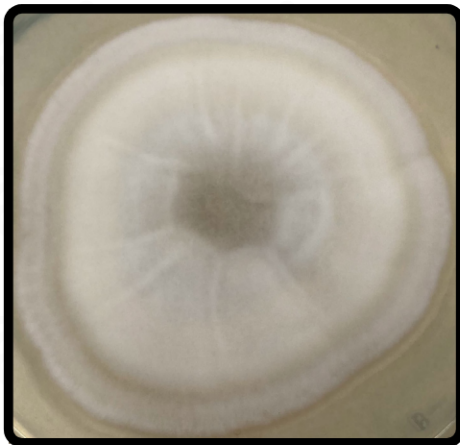
Fundo da placa

Rhizopus sp.

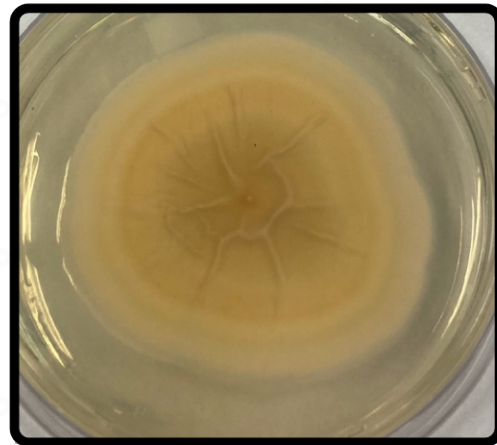
Fungo filamentososo, multicelular, apresenta micélio vegetativo (fixado no meio de cultivo) e reprodutivo (esporos). Este fungo é encontrado no solo e na matéria orgânica em decomposição.

Crescimento em ágar Sabouraud

Características macroscópicas da colônia: Micélio aéreo com textura algodonosa, coloração branca a amarelo.



Frente da placa



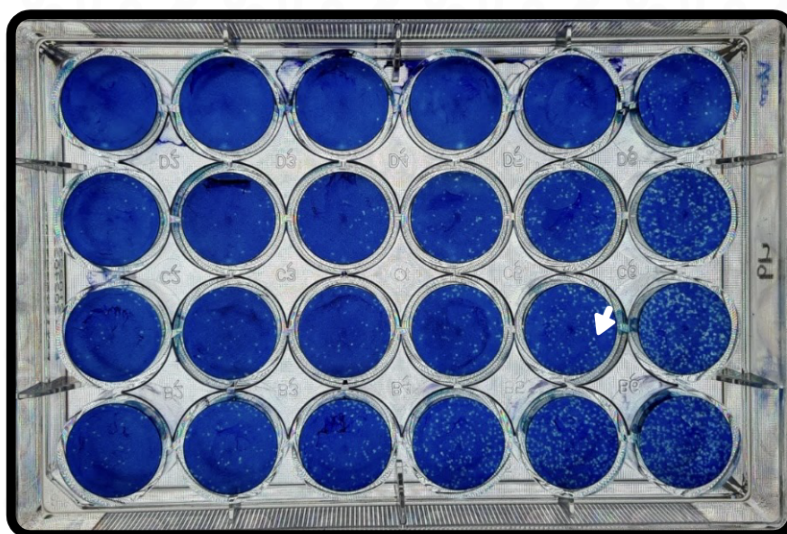
Fundo da placa

Vírus


Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, dependentes do maquinário da célula do hospedeiro para a sua replicação (FERREIRA, 2015).

Com base no tipo celular que infectam, os vírus podem ser classificados em bacteriófagos ou fagos quando infectam bactérias, e vírus de animais ou vírus de vegetais quando infectam células animais e vegetais, respectivamente (LODISH et al., 2000).

A replicação viral *in vitro* exige a preparação de culturas de tecidos animais, culturas puras de hospedeiros bacterianos ou outras células vivas, pois os vírus não se multiplicam em meios de cultura quimicamente sintéticos como as bactérias e os fungos, por exemplo. Desta forma, o cultivo de células hospedeiras é necessário para permitir a replicação viral (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).



Teste: Ensaio de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) (vírus SARS-COV 2). Os pontos claros são as placas de lise, conforme sinalizado com a seta branca.

	Manutenção das culturas bacterianas	Data: 01/11/2021
		Rev. 01/11/2022
		POP 001

1. Objetivo e Campo de Aplicação


Manutenção da biblioteca de culturas bacterianas.

2. Documentos Complementares

- POP - Preparo de meio de Cultura
- POP - Autoclave Vertical
- POP – Esterilização
- POP – Capela de Segurança Biológica

3. Definições

A manutenção das culturas da biblioteca de microrganismos da FAMINAS-BH permitirá dispor a qualquer momento de bactérias para experimentos, trabalhos de conclusão de curso, aulas práticas, entre outros.

	Manutenção das culturas de leveduras	Data: 01/11/2021
		Rev. 01/11/2022
		POP 002

1. Objetivo e Campo de Aplicação


Manutenção da biblioteca de culturas leveduriformes.

2. Documentos Complementares

- POP - Preparo de meio de Cultura
- POP - Autoclave Vertical
- POP – Esterilização
- POP – Capela de Segurança Biológica

3. Definições

A manutenção das culturas da biblioteca de microrganismos da FAMINAS-BH permitirá dispor a qualquer momento de leveduras para experimentos, trabalhos de conclusão de curso, aulas práticas, entre outros.

	Manutenção das culturas de fungos filamentosos	Data: 02/11/2021
		Rev. 02/11/2022
		POP 003

1. Objetivo e Campo de Aplicação


Manutenção da biblioteca de fungos filamentosos.

2. Documentos Complementares

- POP - Preparo de meio de Cultura
- POP - Autoclave Vertical
- POP – Esterilização
- POP – Capela de Segurança Biológica

3. Definições

A manutenção das culturas da biblioteca de microrganismos da FAMINAS-BH permitirá dispor a qualquer momento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos para experimentos, trabalhos de conclusão de curso, aulas práticas, entre outros.

	PREPARO DE MEIO DE CULTURA	Data: 03/11/2021
		Rev. 03/11/2022
		POP 004

1. Objetivo e Campo de Aplicação


Orientar os técnicos e auxiliares do laboratório quanto ao preparo de meios de cultura para as aulas práticas. Este POP será aplicado nas rotinas de preparo de meios de cultivo do laboratório.

2. Documentos Complementares

- POP - Autoclave
- POP – Balança
- POP – Chapa aquecedora com agitação

3. Definições

Os microrganismos requerem fontes de nutrientes adequadas para crescerem como, por exemplo, carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. No ambiente de laboratório, ou seja, *in vitro*, esses nutrientes necessários para o crescimento microbiano são fornecidos utilizando-se meios de cultura (também chamado de meios de cultivo), os quais devem reproduzir as condições

	COLORAÇÃO DE GRAM	DATA: 04/11/2021
		Rev.: 04/11/2022
		POP 005

1. OBJETIVO E CAMPOS DE APLICAÇÃO

Orientar os técnicos de Laboratório quanto à técnica de coloração de Gram (técnica muito utilizada na diferenciação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), tendo como finalidade a montagem de aulas práticas de microbiologia.

2. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

POP- Utilização do bico de Bunsen

3. DEFINIÇÕES

A técnica de coloração de Gram foi desenvolvida em 1883, pelo Dr. Hans Christian Gram, sendo de extrema relevância nos laboratórios de Bacteriologia até hoje, permitindo classificar as bactérias com base no tamanho, morfologia e comportamento diante dos corantes utilizados (ENGELKIRK e DUBEN – ENGELKIRK, 2012).

Na técnica de coloração de Gram o cristal-violeta (conhecido como corante primário) é utilizado para corar de roxo as estruturas celulares de bactérias gram-positivas e gram-negativas; o lugol, também chamado de mordente, apresenta a propriedade de formar grandes cristais com o corante primário impedindo que ele atravesse a parede celular bacteriana; o álcool etílico, agente descolorante é responsável por dissolver os lipopolissacarídeos e lipoproteínas da membrana externa, assim como pela abertura de poros na parede celular de bactérias gram-negativas; e a safranina ou fucsina, (corante secundário) tem a finalidade de corar as bactérias que sofreram com a ação do agente descolorante. O resultado final observado ao microscópio óptico mostra bactérias gram-positivas coradas em roxo e as gram-negativas em rosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

4. RESUMO DO MÉTODO

A técnica é utilizada na identificação de bactérias Gram positivas e/ou Gram negativas com base no resultado final obtido após a utilização dos corantes do Gram.