



PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA COLORAÇÃO DE GRAM

INTRODUÇÃO

Este relatório foi desenvolvido com intuito de abordar de maneira abrangente todo conteúdo estudado, durante o desenvolvimento de técnicas aplicadas a cultura de microrganismos. De um modo geral este trabalho implica em conhecimentos laborais das técnicas aplicadas durante as práticas que foram ministradas, conhecimento de o que é um laboratório de microbiologia, técnicas de assepsia, microrganismos que estão por toda parte nos mais variados ambientes. Este trabalho é um convite ao mundo microbiano, com tudo devemos ressaltar a grande importância de como é feito um trabalho que vai desde a coleta, cultivo e identificação de microrganismos com técnicas de coloração, como podem ser benéficos ou trazer malefícios ao homem, animais e plantas. Pode-se dizer também que o quanto é imprescindível o controle microbiológico, os cuidados em manuseá-los e os riscos que existem não só em um laboratório, mas também no dia-dia.

Por tanto bactéria, fungos de espécies virulentas causam inúmeras doenças que podem ser leves ou mortais, mas há microrganismos que não apresentam risco a saúde do homem, que não apresentam patógenos, claro devidamente manipulados, como bactérias utilizadas na fermentação láctea, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacilos bulgaricus* e leveduras fungos unicelulares que produzem a fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

Laboratório de microbiologia O laboratório de microbiologia desempenha um papel fundamental, tanto em pesquisa quanto em análise, em um laboratório de microbiologia são feitas detecção de organismos patógenos ou não, seja em alimentos ou âmbito clínicos. Pode-se esperar que de um laboratório de microbiologia, segurança, controle e qualidade.

Técnicas de esterilização A esterilização consiste em eliminar todos os microrganismos, há dois métodos utilizados para o controle microbiológico. Método físico e método químico. Método físico: o calor é o método mais empregado para matar microrganismos, por ser eficaz, barato e prático. Obtêm-se através do método do calor eliminação de endósporos bacterianos que são muito resistentes e difíceis de serem eliminados. Sendo assim morrem pela desnaturação de proteínas provocada pelo calor. A esterilização física pode ser obtida por calor úmido autoclavação, pasteurização, calor seco flambagem, radiação, microondas, filtração, pressão osmótica. Método químico: os agentes químicos podem ser esterilizantes matam todos os microrganismos em um ambiente ou material, os desinfetantes reduzem a carga microbiana, antisepsia também é um processo de desinfecção. Alguns grupos químicos utilizados para eliminação de microrganismos, álcoois, aldeídos e derivados, fenóis e derivados, halogênios e derivados, ácidos inorgânicos e orgânicos, entre outros.

Microrganismos no ambiente Os microrganismos estão por toda parte, fungos e bactérias crescem livremente na natureza, porém podemos induzi-los ao crescimento em laboratório, oferecendo para isso meios nutritivos que serão preparados. Através de meio de cultura apropriado para o crescimento de microrganismos, é feita uma análise e levantamento para o que se quer cultivar, seja bactéria, fungo ou outras culturas, feito esta análise é escolhido qual meio de cultura esta irá se desenvolver. Os meios de cultura devem apresentar nutrientes, dos quais são indispensáveis seis elementos químicos: Carbono, Nitrogênio, Oxigênio, Hidrogênio, Enxofre e Fósforo, os quais podem apresentar-se em compostos orgânicos e inorgânicos, dependendo se a bactéria é heterotrófica ou autotrófica. Geralmente, as bactérias de interesse médico são as mesófilas e assim sendo, a temperatura de melhor crescimento deve ser em torno de 25 a 40°C (SOUZA, FERREIRA e LIMA, 2013)

De acordo com a seleção do microrganismo, é preparada uma solução nutritiva com a exigência necessária para o crescimento dos organismos, que se pretende analisar. Elementos para o crescimento fúngico, tais como: carboidratos, proteínas, aminoácidos, sais minerais, ácidos graxos e vitaminas, nenhum deles pode ser considerado um substrato ideal. Além disso, os meios de cultura precisam de condições físicas para o crescimento das colônias, e, portanto, devem ser incubados atentando-se a temperatura, atmosfera gasosa, pH, umidade, entre outras (BASTOS)

Biossegurança em laboratório de microbiologia É de fundamental importância que se tenha conhecimentos sobre biossegurança em laboratórios de um modo geral, mas especificamente em laboratório de microbiologia, onde os riscos são constantes. Os riscos de contaminação por meio biológico são altíssimos, podendo ocorrer contaminação por agentes biológicos caso não sejam tomados devidos cuidados tanto no preparo de matérias que serão utilizados, como soluções, reagentes, amostras, ensaios e matérias de observações e análises. Em fim além do cuidado na higienização de equipamentos de um modo geral, descarte de material asséptico, também há uma grande preocupação na proteção individual ou coletiva, uso de EPIs de forma adequada, presando sempre pela segurança.

Materiais utilizados em laboratório de microbiologia e preparo de meio de cultura Em um laboratório de microbiologia, onde são preparados diversos meio de cultura para espécies distintas de microrganismos, é de se contar com equipamentos e materiais adequados para realização pratica das atividades. Os equipamentos têm que ser de acesso fácil e rápido, sempre esterilizados, antes e depois de cada atividade. Para o preparo de meio de cultura é mantido procedimentos que visam em se obter resultados com qualidade e livre de contaminantes. Os meios de cultura são adequados a cada microrganismo que se queira cultivar, tomando devidos procedimentos adequados aos laboratórios, com protocolos necessários para que ocorra da melhor forma possível cada tarefa cumprida, usando assim os POPs, (Procedimento Operacional Padrão)

são ferramentas que auxiliam ao técnico a desempenhar da maneira certa todo seu trabalho, dispondo de técnicas laborais e uso adequado de materiais e equipamentos, bem como preparo de reagentes, soluções, assim como manutenção, limpeza de equipamentos e seus cuidados de acordo com seus respectivos manuais.

Presença de microrganismos no ambiente A presença de microrganismos em quase todos ambientes, sendo estes ambientes possíveis ou não de contaminação, como alimentos em má conservação, expostos de forma que possam crescer colônias de microrganismos, como bactérias, fungos e outras agentes contaminantes.

Isolamento e obtenção de culturas puras

Organismos microscópios precisam ser isolados Para que possam ser obter melhores resultados na análise de culturas. Isolamento consiste na obtenção de culturas puras, assim é possível identifica-las, saber suas características morfológicas das colônias selecionadas. A maioria dos trabalhos de microbiologia requer culturas puras ou clones da bactéria. O método de isolamento mais comumente utilizado para obter culturas puras e o método de esgotamento por estrias (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012, p. 169)

Coloração de Gram

Na coloração de Gram é possível ter uma visão ampla de determinados microrganismos, bem como suas estruturas, morfologia, seus aspectos, em fim uma melhor definição do mundo microscópio.

A coloração de Gram recebeu este nome em homenagem a seu descobridor, o médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram. Em 1884, Gram observou que as bactérias adquiriram cores diferentes, quando tratadas com diferentes corantes. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, chamadas de Gram-negativas. Após descrição do método, inúmeras propostas de modificação foram feitas (NICÉSIO)

Análise microbiológica de alimentos - Amostragem Com finalidade detectar microrganismos presentes em alimentos, são feitas análise de amostras, parcela de um determinado lote, onde se retira o material a ser analisado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Preparar meio de cultura, para análise de microrganismo que nela venham a crescer.

Objetivos específicos

- Coletar microrganismo no ambiente.
- Analisar colônias de microrganismos em Placa de Petri.
- Contagem de colônias.
- Identificação em coloração de Gram.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias

Quadro 1- Reagentes usados em aula prática

Soluções/Reagentes Água destilada Água peptonada Agar Nutrientes KASVI 500G Agar Sabouraud Óleo de imersão Solução de cristal violeta Solução de lugol (iodeto de potássio - KI) Solução de fucsina Solução álcool - acetona
Fonte: IFMT Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Quadro 2- Equipamentos usados em aula prática

Equipamentos Autoclave Balança Semi-analítica Capela de fluxo laminar Estufa Incubadora de crescimento Incubadora de inoculação Microscópio
Fonte: IFMT Campus Avançado Lucas do Rio Verde

Quadro 3- Materiais e Vidrarias usados em aula

prática Materiais/Vidrarias Alça de inoculação Algodão
Amostra coração suíno Béquer de 10 mL Béquer de 50 mL
Béquer 250 mL Bastão de vidro Bico de Bunsen ou
lâmparina Bolsa estéril Erlenmeyer Espátula Facas
Lamínulas Placas de Petri Pinça Swab Suspensão
bacteriana Tesoura Fonte: IFMT Campus Avançado Lucas
do Rio Verde

MÉTODOS

Aula Prática nº 1 Biossegurança em laboratório de microbiologia Nesta prática instruiu-se o uso adequado de EPIs, equipamentos de proteção individual, assim como de EPCs, equipamentos de proteção coletiva, manejo adequado de soluções, reagentes e equipamentos a ser utilizados durante as aulas práticas. Citou-se para melhor proteção durante as práticas, uso de luvas, máscara de procedimento, jaleco de mangas longas de tecido de algodão, óculos de proteção e boas práticas em laboratório de microbiologia. Citou-se também saída de emergência, lava-olhos, e cuidado no manuseio de descartáveis, como e quando descartar agentes contaminantes; meio de cultura que já não serão mais utilizadas, estas devem ser autoclavadas e descartadas em lixo apropriado para materiais contaminados. Citou-se também a higienização da capela de fluxo laminar, antes e após seu uso, que deve ser feito com álcool 70 %, para que haja a desinfecção do equipamento. Sendo assim trabalhar com segurança e de forma coerente seguindo um roteiro e um procedimento, seguindo um protocolo adequado ao laboratório de microbiologia, executou-se a prática sem incidentes e sem contaminação.

Aula Prática nº 2 Preparação de meio de cultura Ligou-se o fluxo laminar para desinfecção da capela em UV. Nivelou-se a balança, para a pesagem do Ágar Sabouraud. Organizaram-se todos os materiais a serem utilizados, na capela de fluxo laminar. Pesou-se o meio de cultura Ágar Sabouraud a 5,5g . Mediu-se na bureta 100 mL de água destilada. Adicionou-se 50 mL no Erlenmeyer, do meio e depois completou-se com a medida com o restante da água da bureta. Tampou-se com algodão e cobriu-se com papel craft, passou-se fita crepe, e marcou-se com fita autoclave de identificação. Levou-se à autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Retirou-se da autoclave. Distribuiu-se em placa de Petri em 10 mL, depois de solidificado identificou-se com nome e data. Colocou-se na incubadora na temperatura de 37°C para crescimento de fungos ao tempo de 5 a 7 dias.

Aula Prática nº 3 Presença de microrganismos no ambiente
Identificou-se cada placa com meio de cultura Ágar Saboraud, com nome e data e tipo de meio. Placa 1: abriu-se a placa por 20 minutos no chuveiro lava olhos. Placa 2: passou-se um swab na palma da mão, entre os dedos e unhas, em seguida inoculou-se com o meio de cultura. Placa 3: passou-se o swab na superfície da maçaneta da porta do banheiro masculino, em seguida inoculou-se ao meio de cultura. Placa 4: passou-se o swab na superfície da bancada do laboratório, em seguida em inoculou-se ao meio de cultura. Placa 5: passou-se o swab na parte inferior de um celular, em seguida inoculou-se ao meio de cultura. Logo em seguida levou-se as placas com o meio inoculado para incubadora, à uma temperatura de 30°C por um período de 5 a 7 dias.

Aula Prática nº 4 Isolamento e obtenção de culturas puras

Coletou-se de cada placa uma amostra da colônia escolhida, para semear. Repicou-se o material escolhido em placas com meio de cultura estéril. Placa de número 1 com 3 colônia de fungos em formato irregular, fungos apresentaram-se filamentosos de coloração rosada. Amostra retirada da bancada do laboratório. Placa de número 2 com 15 colônias de fungos, arredondadas de coloração esverdeada de tom claro. Amostra exposta no meio externo sobre lava olhos. Placa de número 3 com 1 colônia bem discreta apresentando bordas dispersa, de coloração amarelo, colônia apresentou-se em aspecto filamentosos. Amostra retirada da maçaneta do banheiro masculino. Placa de número 4 com não apresentou crescimento microbiológico. Amostra retirada da parte inferior do celular Placa de número 5 com 1 colônia de fungos filamentosos de formato irregular, coloração esbranquiçada com tom próximo ao amarelo. Amostra retirada da mão. As amostras que foram inoculadas em um meio novo foram acondicionadas na incubadora a uma temperatura de 30°C por 5 - 7 dias, neste espaço de tempo foram analisou-se crescimento de colônia de fungos nas 4 placas.

Aula Prática nº 5 Coloração de Gram Após o isolamento de culturas puras, para o procedimento de coloração de Gram. Como as amostras precisavam ser analisadas, houve-se a necessidade de alterar o roteiro da prática do segundo horário, as amostras de fungos neste experimento foram substituídas por amostras de bactérias, sendo assim bactérias inoculadas no meio de cultura Ágar Nutriente, da aula prática do primeiro horário, meios: JOSE, 2-D.ES.G, 300P NUTR. Esterilizou-se a capela de fluxo laminar. Organizou-se devidamente todo material a ser utilizado, na capela de fluxo laminar. Acendeu-se bico de Bunsen nesse caso, lamparina. Identificou-se a lamínula com nome e data, com auxílio da alça de platina gotejou-se com água destilada em três diferentes pontos da superfície da lamínula. Com a alça de platina flambada, coletou-se um pouco da amostra bacteriana, espalhou-se sobre cada respectiva gota. Primeira amostra: JOSE. Segunda amostra: 2-D.ES.G. Terceira amostra: 300P NUTR. Secou-se as amostras sobre o calor da chama. Levou-se a bancada para coloração de Gram. Cobriu-se o esfregaço com solução de cristal violeta, durante 30s.

Lavou-se com água destilada, sem deixar excesso de água sobre a lamínula. Descorou-se o esfregaço usando álcool a 95%, processo rápido com apenas algumas gotas para evitar descoloração excessiva. Lavou-se imediatamente com água destilada. Cobriu-se o esfregaço com solução de fucsina, durante 30s. Lavou-se levemente com água destilada. Levou-se a lamínula para secar na estufa por alguns minutos. Após alguns minutos retirou-se da estufa e observou-se ao microscópio. Utilizou-se das três lentes objetivas, de 10X,40X,100X, utilizou-se óleo de emersão.

Aula Prática nº Análise microbiológica de alimentos - Amostragem Esta prática mostrou-se com objetivo de identificar possíveis contaminantes. Preparou-se os materiais na capela de fluxo laminar. Em seguida coloca-se o saco estéril sobre a balança semi-analítica. Desinfetou-se com álcool a 70 % a bandeja de amostra antes de abri-la. Com auxílio de uma pinça e faca corta-se em pequenas porções a amostra de coração de suíno. Pesa-se a amostras dentro do saco estéril até dar o peso total de 125 g. Acrescenta-se água peptonada, para imersão das amostras, homogeneiza-se amostra, durante min. Em seguida identifica-se o saco contendo amostras de coração de suíno, leva-se a incubadora no período de 24 hrs em temperatura de 25°C.

Aula Prática nº Análise microbiológica de alimentos - Amostragem Inoculação na Placa de Petri

RESULTADOS Observaram-se colônias de bactérias, com seus seguintes arranjos. Tabela: 1- Coloração de Gram

Amostras	Arranjos Gram	Placa
JOSE	Estreptococos	+ Placa
2-D.ES.G	Estafilococos/Estreptococos	+ Placa
300P	NUTR	

Estafilococos + Fonte: Autor Todas as amostras apresentaram cepas Gram-positivas. Com isso pode-se constatar que a parede celular da bactéria Gram-positiva é única e consiste de uma camada espessa, composta quase que completamente por peptídioglicano, responsável pela manutenção da célula e sua rigidez, dando uma estrutura extremamente forte. Geralmente as bactérias Gram-positivas não apresentam patógenos, algumas bactérias são de grande importância, pois algumas dessas bactérias podem ser usadas na produção industrial como, medicamentos, alimentos, bebidas e no agro negocio. Cerca de 90 a 95% das bactérias Gram-negativas são patogênicas. As paredes mais complexas das bactérias Gram-negativas as tornam mais resistentes e dificultam que os antibióticos e outros medicamentos adentrem em seu interior. Além disso, as bactérias Gram-negativas geralmente são mais ameaçadoras do que as Gram-positivas por terem uma maior virulência e serem ou se tornarem mais facilmente resistentes aos antibióticos.

A técnica de Gram tem também uma grande importância clínica porque permite que as bactérias associadas a infecções sejam prontamente caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, o que permite monitorar a infecção e adotar certas opções de tratamento, mesmo antes que seja feita uma cultura.

DISCUSSÃO

CONCLUSÃO

A técnica da coloração de Gram mostrou resultados satisfatórios, podendo possibilitar uma visualização considerável, tendo como base todo processo desenvolvido ao longo do trabalho, desde o cultivo, semeadura e seleção de colônias puras. Pode-se concluir nesse estudo o quanto é amplo e diversificado o trabalho que envolve a microbiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, P. S. T. G. MEIOS DE CULTURA. pt.scribd.
Disponível em: . Acesso em: 02 setembro 2016. NICÉSIO, R.
G. Biomedicina brasil. Coloração de Gram. Disponível em: .
Acesso em: 07 set. 2016. SOUZA, L. F.; FERREIRA, M. A.;
LIMA, T. C. D. C. CULTIVO DE MICRORGANISMOS COM
TÉCNICA QUANTITATIVA E DE ESGOTAMENTO.
portaleducacao, 2013. Disponível em: . Acesso em: 02
setembro 2016. TORTORA, J.; FUNKE, B. L. R.; CASE, C..
MICROBIOLOGIA. In: TORTORA MICROBIOLOGIA 10ª Edição.
10ª. ed. [S.l.]: ARTMED® EDITORA S.A., 2012. p. 169.
TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia - 4ª Edição.
4ª. ed. [S.l.]: Atheneu, 2004.

ANEXOS

ANEXO A- MÉTODO DE ESGOTAMENTO UTILIZADO PARA ISOLAR CULTURAS PURAS DE BACTÉRIAS (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012) A maioria dos trabalhos de microbiologia requer culturas puras ou clones da bactéria. O método de isolamento mais comumente utilizado para obter culturas puras e o método de esgotamento por estrias (Figura 6.11). Uma alça de inoculação estéril e mergulhada dentro de uma cultura mista, que contém mais de um tipo de micro-organismo, e semeada em estrias na superfície de um meio nutritivo. Ao longo da estria, as bactérias são depositadas quando a alça entra em contato com o meio. As últimas células depositadas na alça são afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas. Essas colônias podem ser repicadas com uma alça de inoculação e transferidas para um tubo de ensaio com meio nutritivo para a obtenção de uma cultura pura contendo somente um tipo de bactéria.

ANEXO

B- COLORAÇÃO DE GRAM (NICÉSIO) Nas bactérias Gram-positivas a parede celular é formada principalmente por ácidos teicóicos e nas bactérias Gram-negativas, é formada principalmente por lipídeos. Por possuírem grande quantidade de ácidos teicóicos, após a coloração, as Gram-positivas formam um complexo corado azul intenso, que não é removido facilmente com álcool-acetona. As Gram-negativas não retêm a coloração após o tratamento com álcool-acetona e são reveladas posteriormente com solução de fucsina ou safranina, apresentando-se na coloração avermelhada.