

| Unidade 1 | Seção 3 |

Roteiro Aula Prática



Microbiologia

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

NOME DA DISCIPLINA: **Microbiologia**

Unidade 2

Seção 2.3

OBJETIVOS

Definição dos objetivos da aula prática

Criar condições didático-pedagógicas para que os alunos desenvolvam seus conhecimentos com relação aos microrganismos e que possam conhecer as características e propriedades biológicas dos principais microrganismos causadores de infecções em seres humanos; compreender o preparo de um meio de cultura, neste caso específico à cultura de fungos do Ágar Sabouraud; identificar macroscopicamente as estruturas de uma cultura de fungos e habituar-se às práticas de laboratório, incluindo o uso de vidrarias, equipamentos, reagentes, de acordo com a Norma Regulamentadora 32 (NR-32).

INFRAESTRUTURA

Instalações

O procedimento será realizado no Laboratório Multidisciplinar.

Materiais de consumo

DESCRIÇÃO	Quant. de materiais por procedimento
Procedimento 1	
Bico de Bunsen	1 para cada 5 alunos
Placas de Petri autoclavadas	5 para cada 2 alunos
Alça de níquel-cromo ou platina	1 para cada 5 alunos
Erlenmeyer 1L	1 para cada 5 alunos
Erlenmeyer 500 mL	1 para cada 5 alunos

Ágar Sabouraud de 500 g	1 por laboratório
Balança analítica	1 por laboratório
Espátula	5 por laboratório
Microondas	1 por laboratório
Álcool 70%	2 por laboratório
Estufa 37°C	1 por laboratório
Tela arame com disco 14X14 cm	1 para cada bico de Bunsen
Rolo de barbante tipo cru	1 por laboratório
Algodão Hidrofóbico	1 pacote por laboratório
Compressa de gaze estéril	1 pacote por laboratório
Papel Kraft	1 rolo por laboratório
Fita de autoclave	1 por laboratório
Esponja de espuma	1 por laboratório
Recipiente para pesagem	5 por laboratório
Proveta graduada 1L	1 para cada 5 alunos
Proveta graduada 100 mL	1 para cada 5 alunos
Barrilete 10L	1 por laboratório
Destilador de água	1 por laboratório
Água destilada	1 por laboratório
Almotolia bico reto	2 por laboratório
Caixa de plástico para lavagem de material	1 por laboratório
Autoclave	1 por laboratório
Procedimento 2	
Lâmina lisa de vidro	4 para cada 2 alunos
Lamínula de vidro	4 para cada 2 alunos
Corante lactofenol azul de algodão 100 mL	1 por laboratório
Frasco conta gotas	4 por laboratório
Alça de níquel-cromo ou platina	1 para cada 5 alunos

Salina estéril (NaCl 0,85 %)	1 para cada 2 alunos
Bico de Bunsen	1 para cada 5 alunos
Culturas de fungos leveduriformes (<i>Candida</i> spp.); Cultura de fungos filamentosos	1 para cada 2 alunos
Álcool 70%	2 por laboratório
Estufa 37°C	1 por laboratório
Microscópio óptico	1 para cada 2 alunos
Lápis dermatográfico	2 por laboratório
Becker graduado de vidro 100 mL	1 para cada 4 alunos
Placa de petri contendo meio Agar Sabouraud estéril	1 para cada 2 alunos

Software:

Sim () Não (X)

Em caso afirmativo, qual?

Pago () Não Pago (X)

Tipo de Licença: NSA.

Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Para a utilização do laboratório multidisciplinar, os alunos devem obrigatoriamente utilizar jaleco de mangas longas, óculos de proteção, calças compridas, calçado fechado onde nenhuma parte do pé fique exposta e cabelo preso.

PROCEDIMENTOS PRÁTICOS

Neste momento é fundamental o resgate de conceitos importantes relacionados à introdução aos fungos. Sugiro que inicie a aula através de um questionamento sobre a importância do estudo desses microrganismos na identificação de possíveis agentes etiológicos de doenças que causam prejuízos à saúde do homem.

Também caberia destacar a importância ecológica pelo seu envolvimento na reciclagem de nutrientes minerais e economia nos benefícios na indústria química, farmacêutica, alimentícia e agrícola.

Nesta aula prepararemos o meio de cultura Ágar Sabouraud e também identificaremos as características estruturais macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos e leveduriformes.

PROCEDIMENTO 1

Atividade proposta

Preparação do meio Agar Sabouraud.

Procedimentos para a realização da atividade

Para o preparo do meio Agar Sabouraud é necessário à completa fusão do meio cultura quando diluído em água destilada, esta fusão pode ocorrer tanto no bico de Bunsen com o auxílio da tela de arame com disco ou no microondas.

É importante salientar que o ideal é a realização dessas técnicas em capela de fluxo laminar, para diminuir os riscos de contaminação. Entretanto em virtude das proporções da aula deverão utilizar o raio da chama do bico de Bunsen como ambiente estéril, tomando todos os cuidados de esterilização dos materiais.

É necessário que antes de iniciar os procedimentos e após a realização destes seja realizada a higienização e antissepsia das mãos.

PREPARO DO MEIO ÁGAR SABOURAUD

- O meio Ágar sabouraud é recomendado para a o cultivo, isolamento e identificação de fungos dermatófitos e leveduras. O ótimo crescimento de fungos se deve às altas concentrações de carboidratos.
- Orientar sobre a leitura do preparo específico de um meio de cultura de acordo com o rótulo informado pelo fabricante.
- A prática deverá ser realizada em grupos e cada grupo preparar 200 mL de meio ágar Sabouraud.
- Dissolver a quantidade de meio de cultura requerida pelo rótulo em água destilada e calcular a quantidade de meio que será pesada para um volume de 200 mL.
- Após a completa dissolução esse meio deve ser fundido e esterilizado.
- Após a esterilização, próximo ao bico de Bunsen para que não haja contaminação do meio, este será vertido na placa de Petri através da deposição de um volume (aproximadamente 20 mL) suficiente do meio na placa de Petri.
- Aguardar sua solidificação.

PROCEDIMENTO 2

Atividade proposta

Identificação das estruturas macroscópicas e microscópicas dos fungos.

Procedimentos para a realização da atividade

Neste procedimento, será realizado a identificação das diferenças estruturais macroscópicas e microscópicas dos fungos leveduriformes e filamentosos (análise macroscópica). A técnica de coloração utilizada será a técnica a fresco utilizando o corante Lactofenol Azul algodão. Neste segundo procedimento também será realizado a técnica de semeadura por estrias de isolamento ou também chamada de esgotamento, utilizando o Agar Sabouraud.

COLORAÇÃO A FRESCO COM LACTOFENOL AZUL DE ALGODÃO

- Visualizar e comparar as características macroscópicas dos fungos filamentosos observando a estrutura do micélio e dos fungos leveduriformes observando as características coloniais de forma ovoide, cor branca-amarelado e aspecto mucoide.
- Fazer uma suspensão utilizando a cepa de *Candida* spp. previamente semeada em meio de cultura ágar Sabouraud com a salina estéril (NaCl 0,85%).
- Semear a suspensão microbiana na superfície da placa de Petri contendo o meio Sabouraud utilizando a alça bacteriológica previamente esterilizada, através de estrias por isolamento ou esgotamento e levar para a estufa em temperatura de 37°C.
- Colocar uma gota do lactofenol azul-algodão sobre a lâmina. Retirar uma alíquota da cultura de levedura, utilizando a alça bacteriológica. Coloque a alíquota sobre a gota de lactofenol na lâmina e homogeneizar,
- Cobrir com a lamínula e examinar ao microscópio óptico utilizando as objetivas de 4, 10 e 40 vezes.
- Esquematize o que foi observado na objetiva de 40X.

CHECKLIST

-  Semeadura prévia de placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com cepas de *Candida* spp. e fungos filamentosos;
-  Placas de Petri vazias esterilizadas;
-  Salina (NaCl 0,85%) estéril;

- + Realização da semeadura utilizando a técnica de semeadura por isolamento;
- + Incubação das placas em estufa à 37°C;
- + Verificar se todos os alunos conseguiram realizar a coleta e a técnica de coloração;
- + Observar se todos os alunos conseguiram identificar as características das células observadas;
- + Certificar se os alunos esquematizaram as estruturas celulares;
- + Possibilitar visita posterior ao laboratório para verificar se as placas se desenvolveram e quais foram as colônias que cresceram;
- + Esclarecer possíveis dúvidas quanto aos procedimentos realizados e as características observadas.

RESULTADOS

Como resultados dessa prática, espera-se a compreensão de como ocorre o preparo do meio de cultura, a semeadura através de estrias por isolamento e as diferenças estruturais dos fungos filamentosos e leveduriformes.

Resgate a importância sobre as práticas de laboratório no reconhecimento dos fungos, especialmente aqueles de importância médica pelo seu potencial prejuízo à saúde do homem.