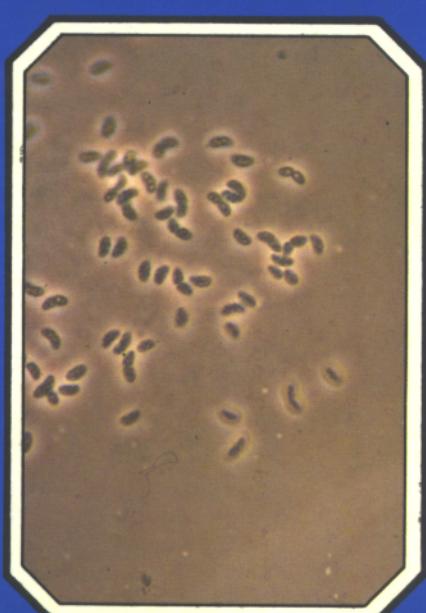
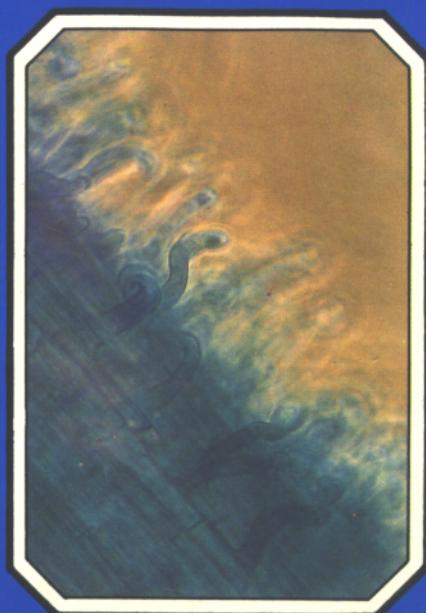
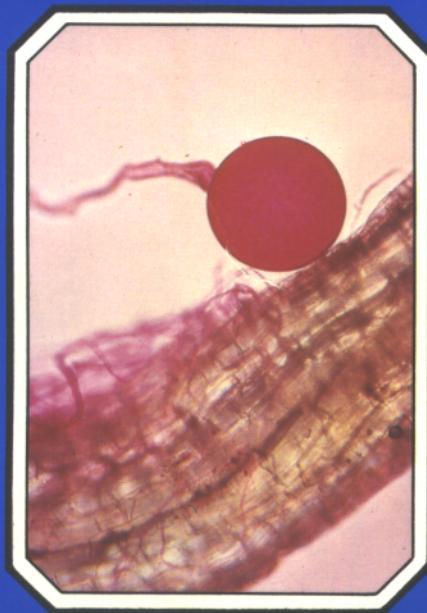


# MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



# **PARTE I. PRINCÍPIOS BÁSICOS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA**

## **CAPÍTULO 1**

### **SEGURANÇA, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS BÁSICAS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO**

*Mariangela Hungria<sup>1</sup>*

*Ricardo S. Araujo<sup>2</sup>*

*Fábio F. de Araújo<sup>3</sup>*

*Euan James<sup>4</sup>*

#### **1.1. Segurança**

##### **1.1.1. Regras Gerais**

Para conduzir trabalhos nos laboratórios de microbiologia, é necessário seguir alguns princípios básicos, essenciais para o bom desempenho do trabalho e para a segurança dos que conduzem os ensaios:

- lavar as mãos antes e depois de terminar um trabalho;
- usar avental e, quando necessário, luvas estéreis descartáveis;
- limpar e desinfestar as bancadas e capelas no início e no final do trabalho;
- não pipetar com a boca;
- não colocar na boca, qualquer material que tenha estado em contato com os agentes potencialmente perigosos (incluindo lápis e caneta);
- ser cuidadoso com materiais que possam causar ferimentos na pele, como seringas, pipetas Pasteur e vidros em geral;
- colocar qualquer material contendo contaminantes em um recipiente que permita a sua esterilização;
- ler atentamente as especificações sobre os produtos químicos que vão ser utilizados;
- fazer o descarte apropriado de materiais microbiológicos, químicos e radioativos;
- não ingerir alimentos ou fumar no laboratório.

<sup>1</sup> Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

<sup>2</sup> Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (CNPAF), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

<sup>3</sup> Engenheiro-agrônomo, curso de pós-graduação em Microbiologia na Universidade Estadual de Londrina e EMBRAPA-CNPSO.

<sup>4</sup> Pesquisador, Ph.D., University of Dundee, Department of Biological Sciences, Dundee, DD1-4HN, Escócia.

### 1.1.2. Segurança no Laboratório

Os acidentes que ocorrem em laboratórios são muitos e, nos de microbiologia, compreendem tanto infecções devido à manipulação de microrganismos, como acidentes com produtos químicos.

O controle dos laboratórios de microbiologia, no Brasil, é pequeno, mas em países onde o controle é mais rígido ainda são relatadas centenas de infecções adquiridas no local de trabalho. De um modo geral, as vítimas desses acidentes são os pesquisadores, auxiliares ou alunos, por falta de conhecimento, falta de proteção ou por descuido no trabalho. O treinamento adequado de todos os que trabalham no laboratório, incluindo trabalhadores esporádicos, como o pessoal de limpeza, pode prevenir a maioria dos acidentes.

### 1.1.3. Contaminação por Microrganismos

Para evitar a contaminação por microrganismos deve-se conhecer:

a) conhecimento do perigo potencial dos materiais e organismos que estão sendo manipulados:

Os microrganismos que podem causar infecções são divididos em quatro grupos de risco ou classes, ordenadas de 1 a 4. A classe 1 inclui microrganismos que não oferecem nenhum perigo ou oferecem perigo mínimo ao trabalhador ou à comunidade; 2 - microrganismos que oferecem risco considerável aos que trabalham no laboratório e que provavelmente não oferecem nenhum risco à comunidade; 3- microrganismos que oferecem algum risco ao trabalhador e podem ser disseminados à comunidade; e 4- microrganismos que oferecem riscos sérios aos trabalhadores do laboratório e à comunidade.

De um modo geral, nos estudos de microbiologia do solo, os microrganismos não são patogênicos ao homem. Contudo, deve-se considerar que os meios de cultura utilizados, extremamente ricos em nutrientes, podem permitir o crescimento de microrganismos potencialmente perigosos que existem no solo, na água ou no ar. Além disso, cuidados especiais devem ser tomados com os microrganismos modificados geneticamente, pois pouco se sabe sobre os riscos potenciais que oferecem. A transferência natural de plasmídeos de microrganismos inócuos para patogênicos ao homem não é provável, mas não pode ser descartada.

Uma das maneiras mais fáceis de evitar a contaminação é pela limpeza constante do laboratório. Alguns cuidados, porém, devem ser tomados pelos que realizam essa limpeza. Meios de cultura já utilizados, pipetas ou quaisquer outros materiais que estiveram em contato com microrganismos que ofereçam algum risco devem ser esterilizados antes da lavagem. Aventais e luvas também são importantes para a proteção do trabalhador.

b) conhecimento das vias de infecção

Os microrganismos podem infectar o homem pela boca (ingestão), pelos pulmões (inalação) e pela pele, particularmente por ferimentos e pelos olhos.

A ingestão pode ocorrer durante o processo de pipetagem e pela contaminação pelos dedos ou quaisquer materiais contaminados do laboratório. Por isso o material do laboratório deve ser restrito ao material de trabalho, obedecendo-se a regra básica de JAMAIS INGERIR ALIMENTOS OU FUMAR no laboratório. Deve-se procurar, ainda, restringir a área de trabalho e proceder continuamente à limpeza e desinfestação. A higiene após o trabalho e o uso de luvas e câmara de fluxo, quando for necessário, não devem ser esquecidos.

A contaminação pela inalação de partículas liberadas durante o trabalho é, com certeza, uma fonte de difícil controle; pode ocorrer através do trabalho com alças de platina, seringas, pipetas, centrífugas, ou durante os processos de homogeneização e abertura de tubos de cultura, entre outros.

A contaminação pela pele pode ser através de injeção, por seringas ou material quebrado, entre outros e, no caso de ferimentos na pele, a entrada de microrganismos é facilitada. Espirrar materiais nos olhos é, freqüentemente, a causa de muitas infecções.

c) métodos para evitar que esses microrganismos tenham acesso às vias de infecção

Para evitar a contaminação por microrganismos devem ser utilizadas algumas barreiras:

- barreiras primárias, ao redor dos microrganismos, para evitar a sua dispersão. Isso inclui, cuidados com pipetagem, com materiais que fiquem na área de contaminação, limpeza da capela e local de trabalho após a manipulação de microrganismos e descarte adequado de materiais
- barreiras secundárias, ao redor do trabalhador, como o uso de aventais e luvas
- barreiras terciárias, para impedir que os microrganismos se espalhem na comunidade, relacionadas principalmente com o descarte dos materiais contaminados.

No planejamento do laboratório, para trabalhar com as classes de microrganismos comumente estudadas nos laboratórios de microbiologia do solo, é essencial que as instalações sejam fáceis de limpar e desinfestar e resistentes aos produtos químicos utilizados. As bancadas devem ser preferencialmente lisas, com altura confortável para o técnico e um local especial deve ser destinado a aparelhos que ofereçam algum risco, como autoclave. O chão deve ser de material que permita a desinfestação constante, mas que não seja escorregadio. A luz e temperatura devem ser adequados, para permitir conforto durante o trabalho. A pia para lavagem das mãos deve ser diferente daquela em que se lavam os materiais de laboratório. Também deve haver um local que permita a estocagem de materiais esterilizados, como meios de cultura e demais acessórios.

Devem ter acesso ao laboratório somente as pessoas que realmente trabalham ali. Essas pessoas, sendo bem treinadas, saberão quais os microrganismos potencialmente perigosos do laboratório e as técnicas para evitar sua disseminação, além de saber como manter o laboratório limpo para evitar contaminação de todos os trabalhos ali conduzidos.

No caso de manipulação de microrganismos potencialmente perigosos à comunidade, deve-se procurar orientação junto aos órgãos de saúde, que saberão especificar os procedimentos para cada caso.

#### **1.1.4. Contaminação por Produtos Químicos**

É importante criar o hábito de, na chegada de cada reagente novo ao laboratório, ler o folheto do fabricante ou o rótulo com as especificações do produto. Constam, ali, informações sobre a temperatura de estocagem do material, tempo de validade do princípio ativo e cuidados que devem ser tomados durante a sua manipulação. Vários produtos empregados nos estudos de microbiologia do solo são tóxicos, cancerígenos ou teratogênicos. É sempre recomendável manter as especificações dos produtos em um local de fácil acesso, pois ali estão incluídos os procedimentos que devem ser tomados em caso de acidentes.

Deve-se preocupar, ainda, com a contaminação do meio ambiente. Na medida do possível, produtos como o bicloreto de mercúrio, algumas vezes recomendado para a desinfestação de sementes, podem ser substituídos por outros desinfetantes, como o hipoclorito de sódio. No caso de produtos como o próprio bicloreto de mercúrio, fenólicos, solventes orgânicos e outros, que podem contaminar os lençóis freáticos, rios e lagos, infelizmente hoje, no Brasil, o controle ambiental depende do discernimento dos responsáveis pelos laboratórios. Nos Estados Unidos e na Europa, vários desses produtos são acondicionados em recipientes adequados e existe um departamento de segurança ambiental encarregado de fiscalizar o seu descarte. Como o Brasil não dispõe de regras para o descarte, um procedimento racional é o de procurar diluir ao máximo possível compostos que ofereçam algum perigo ao ambiente antes de descartá-los e, no caso de materiais altamente poluentes e tóxicos, deve-se providenciar um reservatório para o seu armazenamento.

#### **1.1.5. Contaminação por Produtos Radioativos**

O trabalho com radioisótopos exige que o laboratório se enquadre nas normas exigidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). A autorização para o trabalho com radioisótopos e a fiscalização também estão sob responsabilidade da CNEN e, portanto, o assunto não será abordado aqui, mas convém lembrar apenas os princípios básicos, ou seja:

- quando estiver utilizando material radioativo, fontes seladas ou equipamento que emite radiação ionizante, os cuidados devem ser redobrados;
- o transporte de material radioativo deve ser planejado com antecedência, tomando-se as precauções necessárias. Todo o material radioativo deve ser mantido e transportado em pelo menos dois recipientes pois, no caso de um deles quebrar, haverá uma barreira à contaminação;
- o material radioativo ou em contato com ele deve ser guardado em um local separado no laboratório, com avisos sobre a sua natureza;
- a área de trabalho deve ser restrita e, de preferência, forrada com papel absorvente ou plástico especial. No caso de contaminação do local, isolá-lo e proceder à limpeza cuidadosa;
- o laboratório deve ser continuamente monitorado quanto aos níveis de radioatividade;
- o descarte de material deve obedecer às normas vigentes da CNEN.

## 1.2. Equipamentos e Material de Consumo

### 1.2.1. Equipamentos

Um laboratório de microbiologia do solo necessita alguns equipamentos básicos, que serão descritos a seguir. A inspeção e cuidados periódicos com os equipamentos impedem que eles ofereçam problemas de segurança aos que ali trabalham e aumentam a vida útil do equipamento. Outro ponto importante a ser considerado é o de que, no Brasil, a voltagem é instável. Quase todos os equipamentos são especificados para países que apresentam oscilações menores. Conseqüentemente, JAMAIS ECONOMIZAR em filtros de linha, estabilizadores de voltagem e tomadas com fio terra. É comum observar, em diversos laboratórios, que milhares de dólares são gastos em equipamentos, mas algumas dezenas são economizadas em proteção contra oscilações de voltagem.

#### Microscópios

Os microscópios são grandes aliados dos microbiologistas, não só para a identificação das características morfológicas dos microrganismos com os quais o laboratório trabalha rotineiramente, como também para a execução dos trabalhos de pesquisa que envolvem avaliação e documentação fotográfica de eventos microscópicos.

Os microscópios podem ser dos seguintes tipos:

##### a) Microscópio estereoscópico

Mais conhecido como lupa. Apesar de simples e com poder de resolução inferior ao dos microscópios ópticos, é útil em diversos estudos como, por exemplo, nas alterações dos fenótipos das raízes causadas por microrganismos, detalhes de morfologia de colônias de bactérias e fungos em placas, observações de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares, etc. Um bom microscópio estereoscópico deve possuir oculares com capacidade e aumento de 10X (dez vezes) e lentes com aumentos variáveis de 0,8X a 5X.

##### b) Microscópio óptico (comum, contraste de fase e fluorescência) (Figura 1.1)

No cotidiano, não há necessidade de microscópios ópticos sofisticados, mas alguns requisitos mínimos são essenciais:

- oculares com capacidade de aumento de, pelo menos, 10X;
- objetivas secas de baixa magnificação (10X e 40X);
- objetiva acromática ou “planacromática” (planachromatic) para óleo de imersão (90X a 100X);
- estativa móvel;
- condensador;
- fonte de luz, preferencialmente com ajuste da intensidade luminosa.

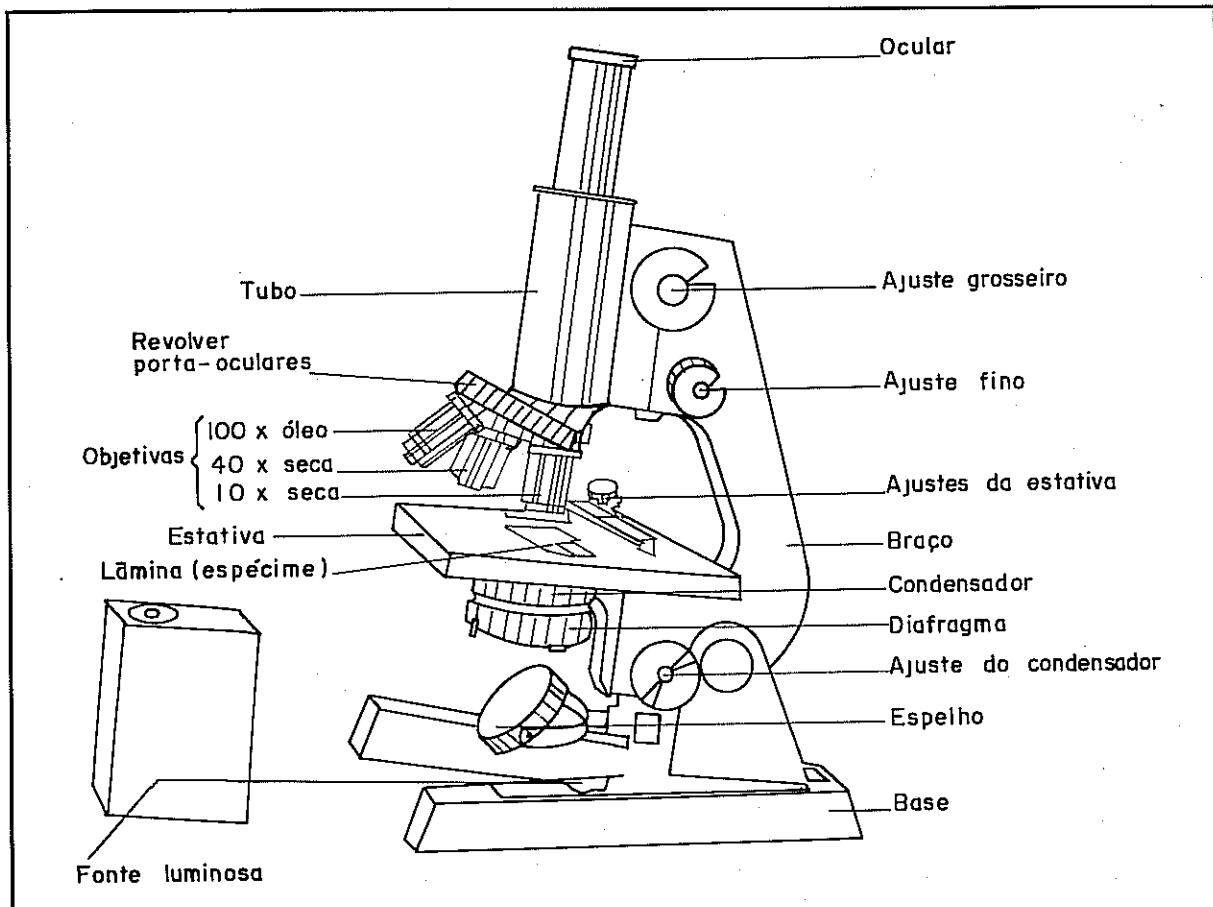


FIGURA 1.1. Representação esquemática das partes de um microscópio óptico.

As instruções para operação dos microscópios dependem de cada modelo. Alguns acessórios podem melhorar o poder de observação do microscópio, tais como os dispositivos para contraste de fase, com condensador e objetivas (10X, 40X e 100X) específicas. Podem ser acoplados, ainda, acessórios como contraste de fase, contraste por interferência diferencial, polarização, câmara clara para desenho microscópico, iluminador e filtros para epifluorescência, equipamento fotográfico, etc. Com esses acessórios, pode-se ter os seguintes tipos de microscópio:

#### b.1) microscópio de fluorescência

O microscópio de fluorescência é um microscópio óptico comum, mas com uma lâmpada capaz de excitar o comprimento de onda necessário. Um filtro primário, também conhecido como filtro de excitação, é colocado entre a fonte de luz e o espécime, permitindo a excitação dos comprimentos de onda necessários. Um segundo filtro é colocado entre o espécime e o observador, transmitindo somente os comprimentos de onda emitidos pelo corpo fluorescente. A vantagem desse método é que os compostos fluorescentes podem ser detectados em baixas concentração; além disso, alguns tecidos vivos, como os cloroplastos, são autofluorescentes, facilitando a visualização.

b.2) microscópio de contraste de fase

O princípio deste método é o contraste entre o limite de visibilidade do microscópio e o limite de resolução, isto é, a capacidade de distinguir formas e dimensões. O contraste avalia, então, a razão entre a intensidade do fundo (background) e a intensidade do objeto. A principal vantagem desse método é que permite a resolução de estruturas que ainda não são visíveis no microscópio óptico comum por falta de contraste com o fundo, bem como permite a visualização de certas estruturas sem corantes.

c) microscópio eletrônico

Os microscópios mais sofisticados são os eletrônicos, que podem ser de varredura e de transmissão. Mais recentemente foram criados os de tunelamento. Os microscópios eletrônicos permitem análises rigorosas dos mais variados espécimes, mas, devido ao custo elevado, não são acessíveis a muitos laboratórios.

c.1) microscópio eletrônico de transmissão

O princípio de funcionamento desse microscópio consiste no aquecimento de um filamento e da aceleração dos elétrons para o anodo. O feixe intenso de elétrons com alta energia passa pelo sistema do condensador, sendo então focado no espécime. Os elétrons que passam pelo espécime são focados pela objetiva e lentes de projeção e formam uma imagem numa tela fluorescente.

c.2) microscópio eletrônico de varredura

Nesse microscópio, um feixe fino de elétrons passa pela superfície do espécime (“varre” a superfície do espécime), em sincronização com a luz de um túnel de raios catódicos. Um detector monitora a intensidade do sinal secundário do espécime e a luminosidade dos raios que passam pelo túnel. Se, por qualquer razão, a intensidade do sinal secundário alterar enquanto os elétrons estiverem “varrendo” o espécime, a imagem do contraste aparecerá.

Incubadoras

Existem diversos modelos de incubadoras, com vários tamanhos e diversas aplicações. As incubadoras menores estão sujeitas a maiores flutuações de temperatura do que os modelos maiores, principalmente quando a incubadora necessita ser constantemente aberta.

Nos trabalhos de microbiologia do solo, as temperaturas para o crescimento dos microrganismos são muito variáveis, de menos de 0° C a mais de 50° C. Incubadoras para temperaturas superiores à ambiental são ajustadas mais facilmente do que quando se necessitam temperaturas inferiores havendo, nesta última, necessidade de um mecanismo adicional de refrigeração. Nos casos em que é necessário manter o nível de umidade, a água pode ser uma fonte de contaminação, particularmente com fungos.

### Banhos-maria

São empregados para os mais diversos fins no laboratório. Deve-se cuidar para que o nível da água no banho-maria esteja sempre no nível do líquido no recipiente. Alguns equipamentos modernos possuem agitadores elétricos, termostatos e superfícies internas revestidas com poliestireno para evitar perdas de calor. Alguns aparelhos são acoplados a sistemas de refrigeração para a obtenção de temperaturas mais baixas; neste caso, existe um reservatório adicional de água, com sistema de resfriamento e fluxo contínuo.

### Centrífugas

#### a) Centrífugas comuns

De um modo geral, uma centrífuga para tubos de 15 mL a 50mL e velocidade de 4000 rpm é adequada. Os tubos devem ser fechados, para maior segurança, mas devem permitir a passagem dos aerossóis desprendidos durante a centrifugação. Os equipamentos devem, também, possuir travas automáticas que não permitam a abertura do rotor antes do término da operação.

A colocação dos tubos na centrífuga, normalmente feitos de plástico, vidro ou alumínio, deve obedecer a posições ortogonais balanceadas em termos de peso. Eles devem estar posicionados em pares opostos, sendo conveniente marcar cada par para facilitar o reconhecimento.

As instruções gerais para o uso da centrífuga são:

- selecionar dois tubos de mesmo tamanho e espessura, adicionando o líquido a ser centrifugado em um tubo e água (ou outra amostra líquida) no outro tubo, equilibrando os pesos;
- colocar os tubos na centrífuga em posições opostas;
- fechar a centrífuga e regular a velocidade e tempo desejados. Algumas centrífugas exigem um aumento gradual de velocidade, evitando sobrecargas ao motor no início da operação. Nesse caso, o tempo de centrifugação deve ser recalculado.

#### b) Ultracentrífuga

Alguns trabalhos exigem uma centrífuga que atinja velocidades maiores, permitindo a separação de partículas menores (baixo peso molecular). Para esses casos, existem ultracentrífugas, que atingem velocidades de até 80.000 rpm. A refrigeração nessas centrífugas é obrigatória, evitando o superaquecimento, mas também permite a manutenção de temperaturas baixas que são necessárias em alguns ensaios. Ultracentrífugas, porém, exigem maiores cuidados no uso e inspeções periódicas. Uma planilha de uso auxilia no planejamento do tempo necessário para a inspeção.

Observações gerais sobre o uso de ultracentrífugas:

- verificar, para a velocidade pretendida e tipo de centrifugação, qual o rotor e tubos apropriados; para isso, consultar a tabela de especificações que acompanha a ultracentrífuga;
- nessas tabelas, é fornecido o campo de centrifugação relativo (RCF, relative centrifugal field), que representa a aceleração centrífuga em relação ao padrão de aceleração da gravidade ( $g = 9.807 \text{ mm/s}^2$ ), na velocidade máxima do rotor (esta, por sua vez, determinada pelo raio do rotor). Constam, ainda, as velocidades em rpm (revoluções por minuto) e  $g$  (aceleração da gravidade). A relação entre  $g$  e rpm pode ser vista na Figura 1.2.

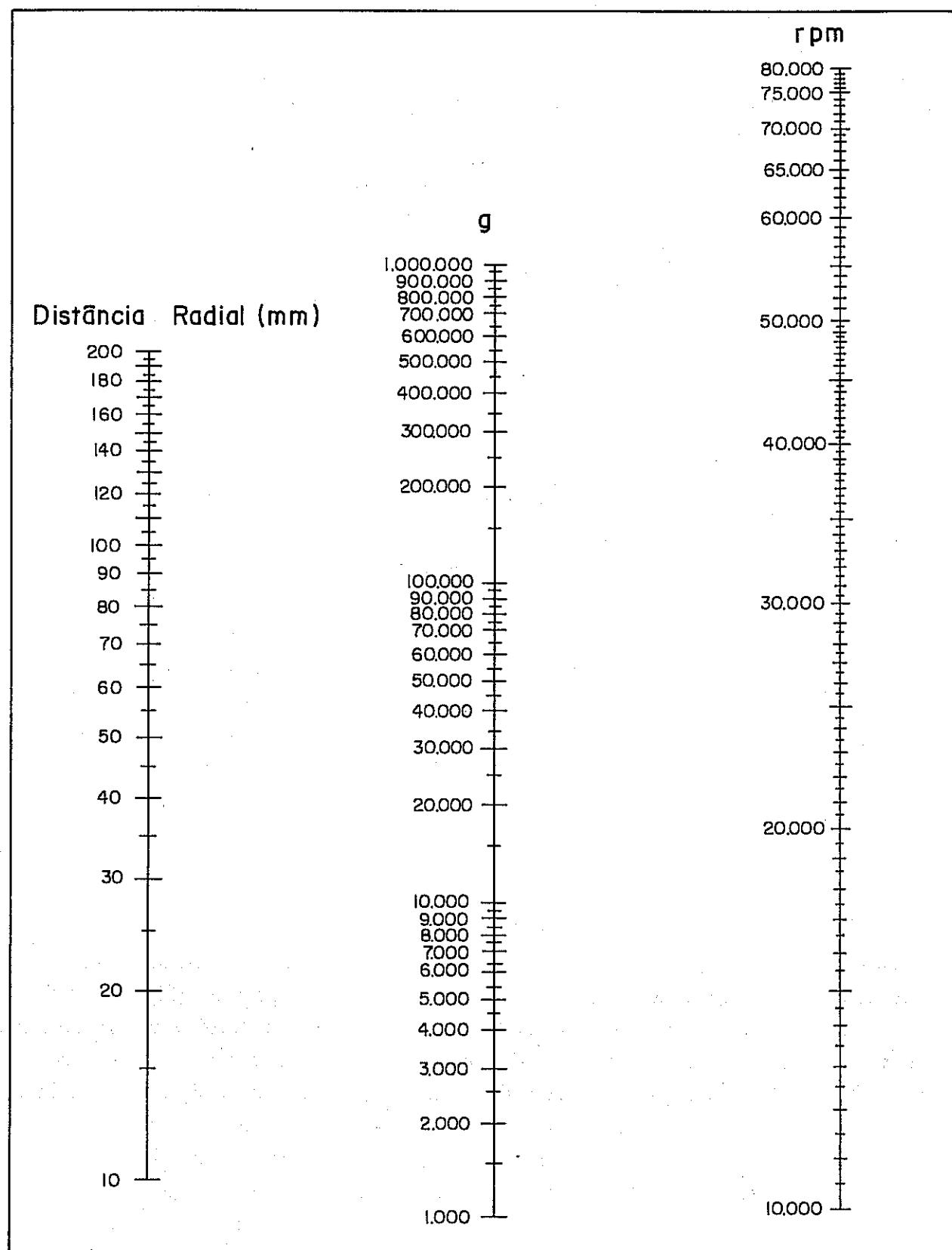


FIGURA 1.2. Relação entre o diâmetro do rotor e os valores de  $g$  e rpm em ultracentrífugas.

- a velocidade máxima permitida para cada rotor é indicada pelo seu nome (por exemplo, o rotor SW55Ti permite 55.000 rpm);
- JAMAIS exceder a velocidade máxima recomendada para o rotor;
- o tempo recomendado para a centrifugação é considerado a partir do momento em que o rotor atinge a velocidade desejada;
- se a trava da ultracentrífuga apresentar algum problema, esperar o rotor parar completamente antes de abri-la.

c) Microcentrífuga

Hoje, a maioria dos laboratórios possui, também, uma microcentrífuga. Esse equipamento permite a centrifugação de pequenos volumes (os tubos têm capacidade de 0,5 mL a 2,0 mL) a velocidades entre 10.000 rpm a 12.000 rpm. Essas centrífugas são práticas e permitem a manipulação de um grande número de amostras.

Câmaras de segurança microbiológica

Estas câmaras são utilizadas para capturar e reter partículas do ar durante as manipulações, diminuindo a contaminação do material manipulado. No caso de organismos patogênicos, as câmaras têm por finalidade, ainda, proteger os técnicos do laboratório contra infecções devido à inalação.

Existem modelos diferentes de câmaras para a manipulação microbiológica; esses equipamentos utilizam o princípio de fluxo contínuo, sendo por isso também denominados de câmaras de fluxo laminar, caracterizadas pela circulação constante de ar dentro do equipamento.

Existem, basicamente, dois tipos de fluxos laminares: fluxo vertical e fluxo horizontal.

a) Câmaras de fluxo laminar vertical

Possuem filtros de ar na parte superior e um difusor, além de uma proteção frontal para o técnico (Figura 1.3). Devido à maior proteção, esse tipo de equipamento é recomendado para manipulações com organismos patogênicos.

b) Câmara de fluxo laminar horizontal

Nesse tipo de câmara, os filtros de ar também estão localizados na parte superior, mas os difusores estão em posição frontal ao operador, expelindo o ar filtrado para fora (Figura 1.4). Como não há proteção frontal na câmara, o manipulador é exposto à inalação do fluxo remanescente e, por isso, esse equipamento não deve ser utilizado durante a manipulação de organismos patogênicos.

As câmaras normalmente vêm equipadas com fontes de luz ultravioleta, para facilitar a desinfestação. Uma proteção contra a luz ultravioleta pode ser adquirida diretamente do fabricante, mas também pode-se colocar qualquer material que bloqueie a passagem dos raios ultravioleta; todas as pessoas do laboratório devem ser avisadas sobre o perigo da exposição a esses raios. Uma inspeção periódica dos filtros de ar e do fluxo é necessária, devendo-se proceder, periodicamente, à troca dos filtros. Uma planilha com o número de horas de uso na capela auxilia o planejamento da época de inspeção.

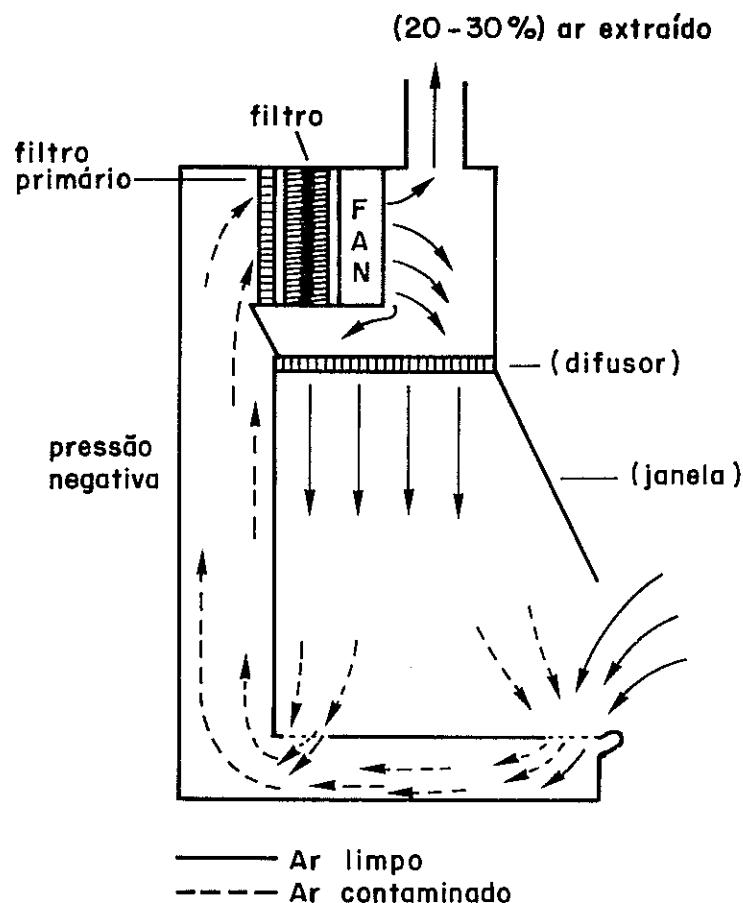


FIGURA 1.3. Representação esquemática de uma câmara de fluxo vertical.

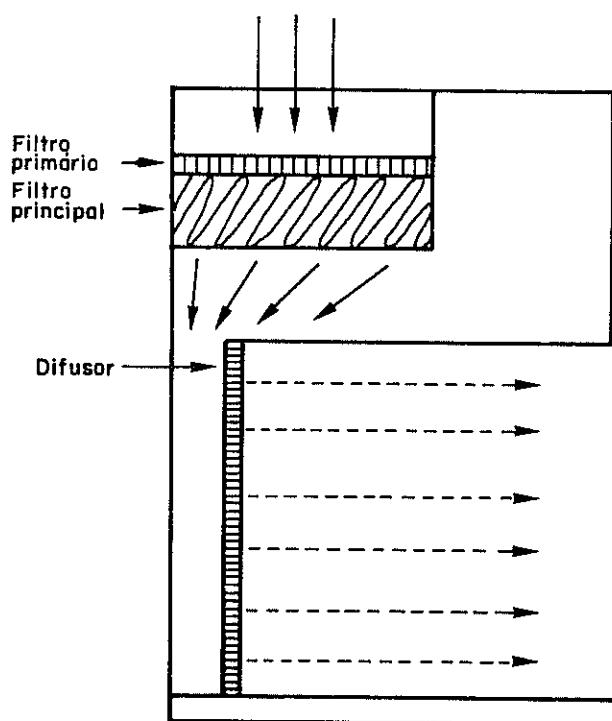


FIGURA 1.4. Representação esquemática de uma câmara de fluxo horizontal.

Recomenda-se desinfestar a câmara e ligá-la cerca de 10 minutos antes de usá-la; após cada etapa de manipulação, convém esperar de dois a três minutos, para que os aerossóis desprendidos possam ser filtrados novamente. A eficiência das câmaras depende também da localização correta e manutenção do equipamento, devendo-se evitar locais próximos a portas e janelas. Recomenda-se o posicionamento em locais mais reservados, livres de movimentação constante de pessoas ou equipamentos e correntes de ar.

Na falta desse equipamento, desde que não se trabalhe com microrganismos patogênicos, pode-se improvisar uma câmara, conforme ilustrado na Figura 1.5.

### Autoclaves

Dois tipos de autoclave são utilizados em laboratórios de microbiologia: autoclave tipo “panela de pressão” e os modelos automáticos.

O princípio de funcionamento das autoclaves do tipo “panela de pressão” é o da fervura da água sob pressão. O equipamento possui válvula de segurança, manômetro e válvula de descarte de ar e vapor (Figura 1.6). Após o aquecimento da água por queimadores externos, serpentina ou aquecedor elétrico, o vapor entra na câmara interna da autoclave. Deve-se permitir que esse vapor remova todo o ar do interior da câmara, antes de fechar a válvula de escape. O tempo e pressão desejadas são estabelecidos e, ao fim do processo, a fonte de aquecimento é desligada, permitindo-se o resfriamento da autoclave. Quando o manômetro indicar pressão zero (o que, na verdade, indica a pressão ambiente), a válvula de descarga deve ser cuidadosamente aberta, permitindo a saída do excesso de vapor. Deve-se dar atenção a essa última etapa, pois se a autoclave ainda estiver sob pressão, pode haver explosão de líquidos, queima de papel, derramamento de líquidos, etc. VÁRIOS ACIDENTES, COM QUEIMADURAS SÉRIAS, SÃO RELATADOS CONSTANTEMENTE PELO USO INADEQUADO DE AUTOCLAVES. Ainda que com pressão nula, os vapores de gases e líquidos quentes podem causar acidentes.

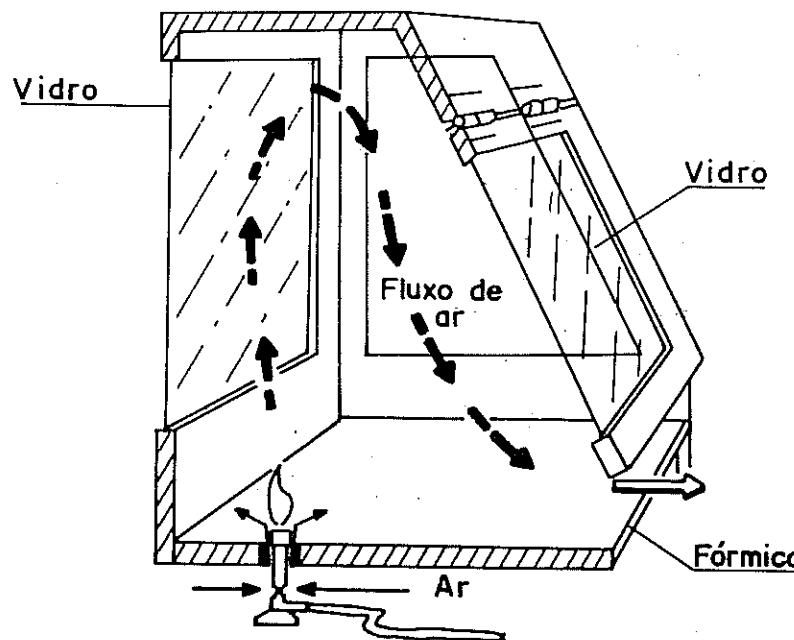


FIGURA 1.5. Câmara asséptica que pode ser construída no laboratório.

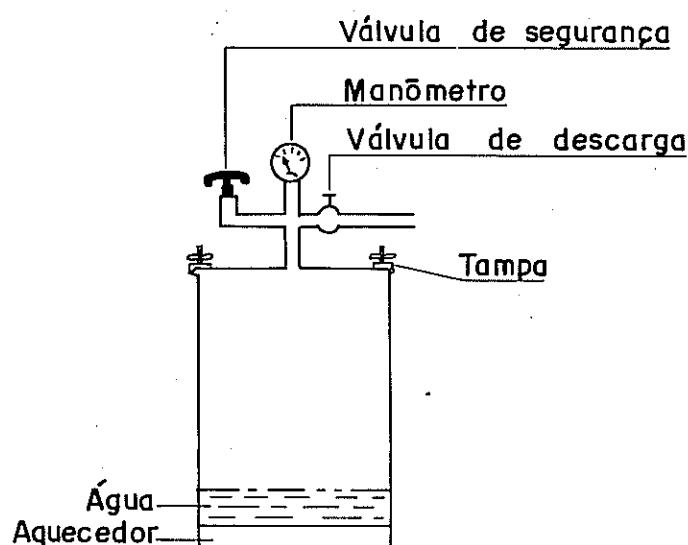


FIGURA 1.6. Esquema representativo de uma autoclave do tipo “panela de pressão”.

Nas autoclaves automáticas, a descarga de vapor são controlados automaticamente, mas o princípio é o mesmo.

Existem dois tipos de autoclavagem: o de exaustão lenta, para líquidos em geral e o de exaustão rápida, para vidraria fechada, filtros de papel, etc.

#### Outros equipamentos

Para o armazenamento de microrganismos, congeladores a -80° C, liofilizadores ou tambor para nitrogênio líquido são os mais indicados, e mais detalhes serão dados no capítulo 5 da seção III.

Nos trabalhos de rotina em microbiologia utiliza-se, constantemente, outros equipamentos como: balança analítica, potenciômetro, bomba de vácuo, chapa de aquecimento, espectrofotômetro, entre outros. Estes equipamentos facilitam a rotina do laboratório.

Hoje, com os avanços nos estudos de biologia molecular, outros equipamentos foram incorporados à rotina de um laboratório de microbiologia: fonte de eletroforese, transiluminador com câmera fotográfica tipo Polaroid, sonicador, termociclador, concentrador a vácuo, entre outros.

#### **1.2.2. Material de Consumo**

##### Alças de platina para inoculação

As alças mais utilizadas para a inoculação de meios de cultura são as de platina, que podem ser compradas ou confeccionadas no próprio laboratório. Para isso, utiliza-se um cabo onde são inseridas as extremidades de um fio de platina 28-G. O fio é torcido várias vezes, deixando-se um círculo aberto em sua extremidade (Figura 1.7). Outros metais menos nobres podem ser utilizados, mas não são recomendados.

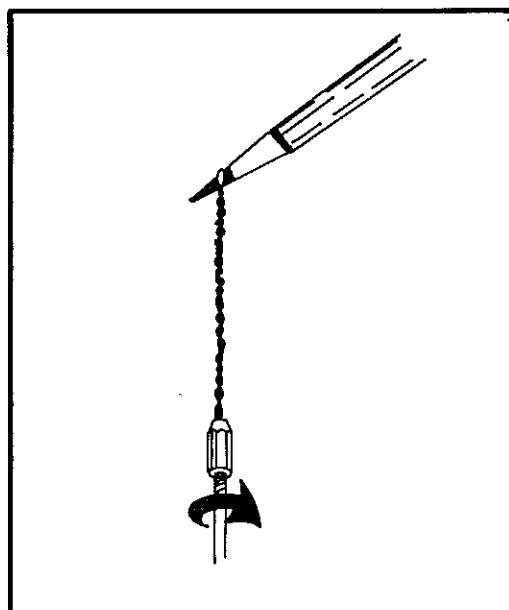


FIGURA 1.7. Esquema de confecção de uma alça de platina.

#### Bastão de vidro para espalhar o inóculo líquido

Também pode ser comprada ou confeccionada no próprio laboratório. Neste último caso, utiliza-se um bastão com espessura aproximada de 4 mm, torneado ao fogo (Figura 1.8).

#### Vidraria

A vidraria empregada nos laboratórios deve ser, preferencialmente, de “borossilicato”. As placas de Petri, de diversos tamanhos, podem ser esterilizadas inúmeras vezes. Essa esterilização é normalmente feita com ar quente, embrulhando-as em papel resistente. Existem, também, placas descartáveis de plástico, que facilitam muitos trabalhos.

#### Tubos de ensaio e pipetas

Existem tubos de ensaio de diversos tamanhos, fabricados com vidro refratário, alguns com tampa rosqueável. São disponíveis, também, diversos tipos de pipetas graduadas, pipetas tipo Pasteur e pipetas automáticas de um ou mais canais, com capacidade de 1  $\mu\text{L}$  a 50 mL.

#### Outros tipos de vidraria

No laboratório é necessário ter, ainda: bêqueres, erlenmeyers, provetas, “kitasatos” e outros tipos de vidraria, que são utilizadas em diversas etapas do trabalho rotineiro do laboratório.

#### Bico de Bunsen

Este equipamento é muito utilizado no dia a dia do laboratório de microbiologia, sendo utilizado para a esterilização rápida de instrumentos de vidro e metal, principalmente alças de platinas.

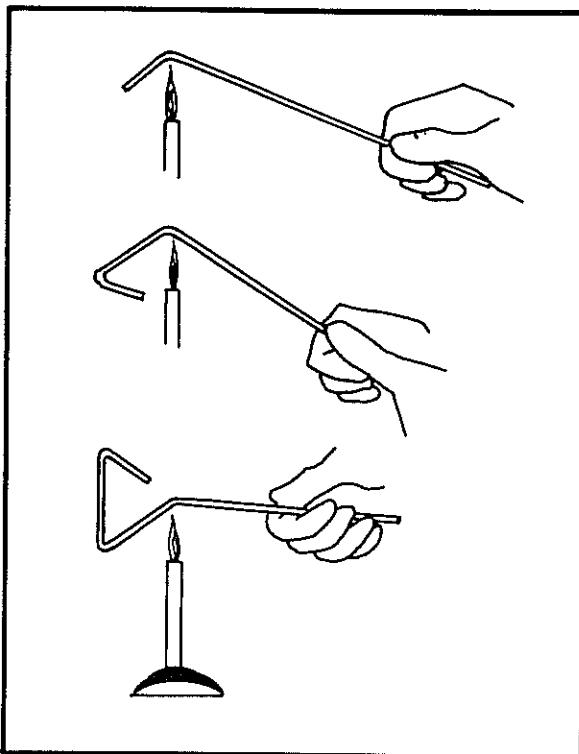


FIGURA 1.8. Esquema de confecção de um bastão de vidro para espalhar inóculo líquido.

### 1.3. Técnicas Básicas em um Laboratório de Microbiologia

#### 1.3.1. Esterilização e Desinfestação

Através da esterilização, procura-se eliminar completamente todos os organismos vivos, incluindo esporos. Já o termo desinfestar significa “tirar o que infesta”, devendo-se dar preferência a esse termo em relação a outros como desinfeccionar e desinfetar, que significam “fazer desaparecer a infecção”. Pela desinfestação, todos os organismos em estado vegetativo são eliminados o que não inclui, necessariamente, os esporos.

##### 1.3.1.1. Esterilização

A esterilização expressa a probabilidade estatística de produzir um sobrevivente e os métodos empregados devem apresentar uma probabilidade inferior a  $10^{-6}$  de permitir a sobrevivência de um organismo. Diversos estudos foram conduzidos procurando determinar o tempo necessário para eliminar os microrganismos e, exceto pela filtragem, os outros métodos avaliam a taxa de mortalidade do processo. O valor D representa o tempo necessário, em uma determinada temperatura, para causar uma redução decimal (90%) da população microbiana. De um modo geral, a temperatura necessária é indicada como um subscrito, por exemplo,  $D_{100}$ . Esse valor D é estimado pela regressão gráfica ou matemática entre o tempo de esterilização e o número logarítmico dos sobreviventes. Para o cálculo desse valor D, podem ser utilizados esporos resistentes ao calor ou o organismo a ser estudado. No caso de indústrias, os estudos devem ser feitos, preferencialmente, com esporos incluindo-se, pelo menos, três repetições.

Os métodos de esterilização são:

Pelo fogo

Utilizada principalmente para a esterilização de instrumentos, como alça de platina e bastões de vidro.

Vapor sob pressão (autoclavagem)

É o método mais comumente empregado nos laboratórios de microbiologia do solo. Serve para esterilizar meios de cultura, equipamentos e vidraria. No caso de líquidos, deve-se observar que o tempo de esterilização depende do volume, conforme pode ser visto na Tabela 1.1.

Para meios de cultura, os tempos de esterilização normalmente utilizados são:

até 500 mL	20 minutos
1000 mL	30 minutos
2000 mL a 4000 mL	40 minutos
5000 mL a 8000 mL	60 minutos

Calor seco (ar quente)

Método utilizado amplamente em hospitais e diversos laboratórios, particularmente para a esterilização de vidraria, equipamento metálico e materiais que não podem ser esterilizados por calor úmido, como algumas graxas. O princípio de esterilização é o de morte por oxidação dos componentes intracelulares, mas os esporos são mais resistentes. O tempo necessário para a esterilização por calor seco é maior do que o necessário para esterilização por calor úmido (Tabela 1.2).

TABELA 1.1. Tempo necessário para atingir a temperatura de 121º C, em uma autoclave, em função do volume de líquido e do número de recipientes, considerando uma temperatura inicial de 26º C a 28º C. Segundo Phillips & Miller (1975).

Volume do Líquido (L)	Número de Recipientes	Tempo para Atingir 121º C (min)	Tempo Total do Ciclo (min)
0,5	30	19	29
1,0	20	34	44
2,0	10	37	47
3,0	8	43	53
4,0	5	52	62
5,0	5	60	70
6,0	4	62	72

TABELA 1.2. Tempo necessário para a esterilização pelo método calor seco (com ar quente).

Temperatura (° C)	Tempo de Esterilização (h)
170	1,0
160	2,0
150	2,5
140	3,0

Vapor sem pressão (Tyndallização)

Consiste de uma caixa de metal com água e uma fonte de aquecimento na parte inferior; a esterilização é feita pelo calor liberado durante a evaporação da água, que é posteriormente condensada. Esse processo é extremamente lento, mas pode ser empregado para a esterilização de alguns meios que sofrem hidrólise em temperaturas elevadas.

Gases

A esterilização por gases é recomendada para os materiais que não podem ser esterilizados por outros métodos, como alguns equipamentos cirúrgicos. Os gases empregados normalmente são o óxido de etileno e o formaldeído.

Filtragem

A filtragem é utilizada para emulsões e soluções que podem ser desnaturadas em altas temperaturas como, por exemplo, soluções de antibióticos e vitaminas. Existem dois tipos de filtro, os filtros de profundidade, que permitem a filtragem de volumes maiores e os filtros de membrana, muito eficientes, mas capazes de filtrar apenas pequenos volumes. Esses últimos são os mais empregados nos laboratórios de microbiologia. Existem porta-filtros, de diversos diâmetros, mas os mais comuns são os de 25 mm e 47 mm. Internamente são colocados os filtros e o conjunto é esterilizado. Para a filtragem de bactérias deve-se utilizar filtros com poros < 0,2 µm, de material compatível com o solvente.

Radiação

A radiação, empregada nos processos de esterilização, pode ser ionizante ou não ionizante e a sua eficácia depende da dose absorvida e do material a ser esterilizado.

### Radiação ionizante

Inclui as partículas beta ou elétrons e as radiações eletromagnéticas, com radiação gama ou raios X. As doses de radiação são expressas em rad, que é equivalente à energia de absorção de 100 ergs/g, sendo normalmente expressas em Mrad ( $10^6$  rad). A esterilização por elétrons, conseguida através de aceleradores, apresenta baixo poder de penetração dos elétrons e não é empregada nos estudos de microbiologia do solo no Brasil. Os raios ultravioleta são utilizados em desinfestações, conforme exposto anteriormente, mas o seu uso em larga escala é dificultado pelo baixo poder de penetração. Os raios X são mais utilizados nas indústrias de alimentos e seu uso é limitado, pois freqüências diferentes podem ser necessárias para eliminar microrganismos diferentes.

O método de esterilização por radiação mais utilizado na área de microbiologia do solo é pelo uso de raios gama, havendo diversos estudos sobre o seu emprego na esterilização da turfa para inoculantes. De um modo geral 2,5 Mrad são suficientes para matar os organismos mais resistentes mas, no caso da turfa, diversos trabalhos indicam que pelo menos 5,0 Mrad são necessários para se conseguir um bom nível de desinfestação. Com o aumento da venda de inoculantes em turfa esterilizada o emprego dos raios gama pode aumentar consideravelmente.

#### **1.3.1.2. Desinfestação**

Diversos produtos químicos são utilizados para a desinfestação e os mais comumente empregados são o álcool e o hipoclorito. Os hipocloritos são efetivos contra bactérias em estado vegetativo, esporos e fungos. As concentrações normalmente empregadas na rotina do laboratório de variam de 1:40 a 1:100 (peso:volume) e, no caso de hipoclorito comercial (água sanitária), as diluições empregadas variam de 1:10 a 1:25. No Brasil, o álcool é muito utilizado na forma comercial, que normalmente apresenta uma concentração de 90%.

Para a esterilização de incubadoras ou ambientes fechados, o formaldeído pode ser utilizado, embora cause irritação nos olhos. Para a desinfestação das bancadas de trabalho, pode-se empregar desinfetantes domésticos diluídos em água conforme as recomendações dos fabricantes.

#### **1.3.2. Técnicas de Inoculação de Bactérias**

Para que a inoculação ou semeadura de um meio de cultura seja bem sucedida, algumas regras básicas devem ser obedecidas: a alça de platina precisa ser flambada antes e depois de cada inoculação, todo o material contendo meio de cultura deve ser aberto perto do bico de Bunsen, as bocas dos tubos de ensaio devem passar pela chama do bico antes e depois da retirada do material e a tampa nunca deve ser colocada sobre o balcão de trabalho, devendo ser mantida presa na altura do dedo mínimo.

#### Inoculação em tubos ou frascos com meio líquido, semi-sólido e sólido

A inoculação é feita pela transferência do inóculo com alça de platina ou com pipeta para o meio líquido. No caso da inoculação em meio semi-sólido (com 1,8 a 2,0 g de ágar/L), a alça de

platina ou ponta da pipeta são introduzidas a uma profundidade de 0,5 a 1,0 cm de profundidade, para as bactérias que precisam de uma pressão de oxigênio mais baixa. No caso de transferência para meio sólido (15 a 20 g de ágar/L), preferencialmente inclinado, deve-se fazer estrias na superfície do meio (Figura 1.9). No caso de bactérias anaeróbias, é recomendada a transferência profunda em meio sólido.

#### Inoculação em placa com meio sólido

Também conhecida como técnica de esgotamento. Consiste em espalhar um inóculo inicial de modo sucessivo, de modo a obter colônias isoladas, existindo basicamente dois tipos de riscagem de placa (Figura 1.10). A riscagem da Figura 1.10a é mais mais utilizada em isolamentos iniciais e a representada na Figura 1.10b é empregada na obtenção de colônias isoladas (Figura 1.11). Alguns cuidados básicos recomendados para a riscagem representada na Figura 1.10b são: flambar a alça depois de cada movimento, esfriando-a no ágar na extremidade das placas; as placas devem ser invertidas antes da incubação, evitando a contaminação por gotículas de água que condensam na parte interna da tampa da placa.

#### Inoculação por plaqueamento

Essa técnica é mais conhecida pela denominação de “pour plate”, sendo utilizada para a obtenção de culturas isoladas ou para a contagem de colônias em placas. Uma alíquota de inóculo líquido é transferida para placas estéreis e, em seguida, 15 mL a 20 mL de meio sólido fundido (mantido à temperatura de 40° C a 45° C) é colocado sobre o inóculo. As placas são rodadas suavemente para misturar o inóculo com o meio. Após a solidificação, elas são invertidas e incubadas.

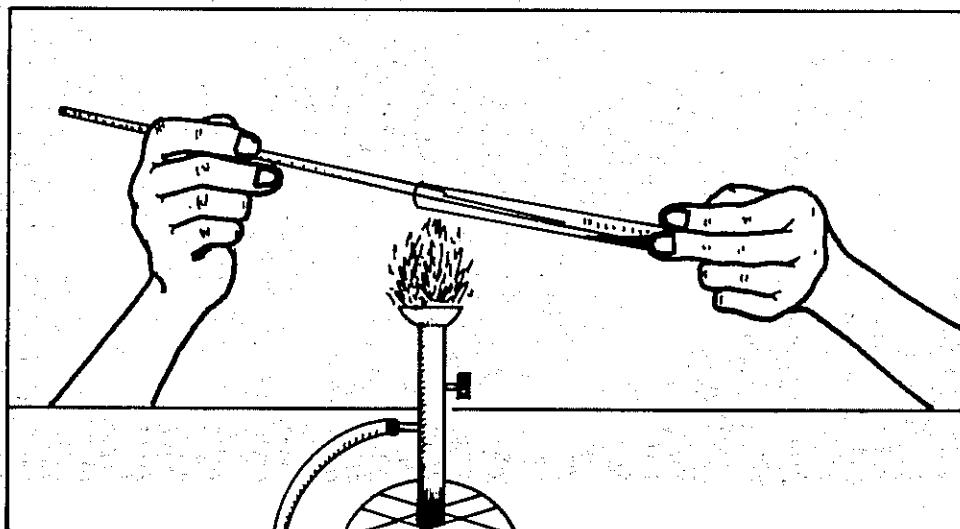


FIGURA.1.9. Inoculação em um tubo contendo meio sólido.

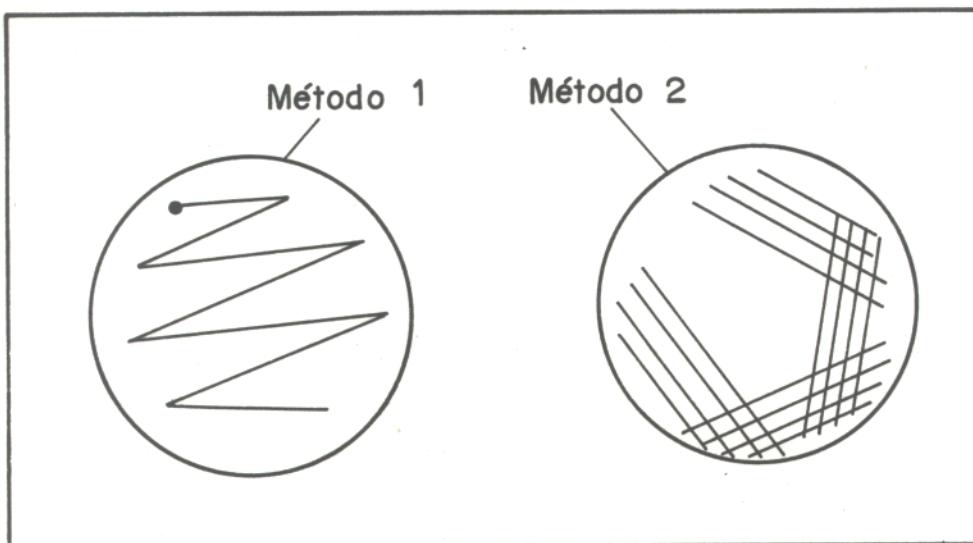


FIGURA. 1.10 Representação esquemática da riscagem em placas com meio sólido. À esquerda, a técnica mais utilizada em isolamentos iniciais e à direita, a técnica recomendada para a obtenção de colônias isoladas.

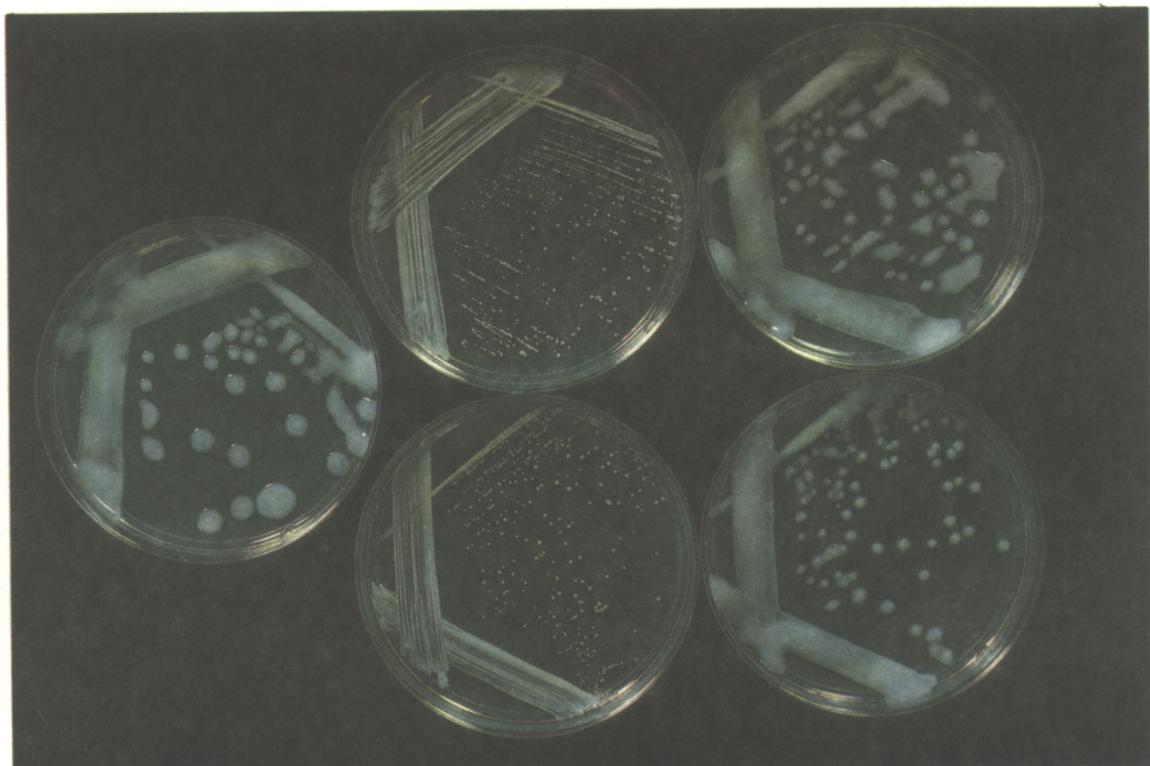


FIGURA 1.11. Colônias isoladas obtidas pela técnica de semeadura em placa com meio sólido.

### 1.3.3. Microscopia

#### 1.3.3.1. Microscópio óptico

Permite uma série de estudos, devido ao poder de resolução maior em relação ao olho humano (Tabela 1.3)

#### Coloração do material para o microscópio óptico

O objetivo da coloração nos microscópios ópticos é o de melhorar o contraste dos espécimes, o que permite a diferenciação de diversos elementos histoquímicos. Alguns corantes empregados estão listados na Tabela 1.4.

TABELA 1.3. Comparação entre o tamanho de diversas partículas e o poder de resolução do olho humano e dos microscópios.

Partícula/Microscópio	Tamanho ou Poder de Resolução
Mitocôndria	0,1 - 1,0 µm
Membranas intracelulares	5,0 - 10,0 nm
Molécula de hemoglobina	5,0 nm
Ribossomo citoplasmático	19,0 - 26,0 nm
Olho humano	100,0 - 200,0 µm
Microscópio óptico	0,2- 0,4 µm
Microscópio eletrônico	1,0 - 2,0 nm
Espessura de cortes para microscópio óptico	1,0 - 10,0 µm
Espessura de cortes para microscópio eletrônico	< 100,0 nm

TABELA 1.4. Coloração adquirida após a preparação de tecidos com corantes empregados nos estudos de microscopia óptica.

Corante	Partícula	Cor
Azul de toluidina	RNA	roxo
	DNA	azul
	polifosfatos	vermelho
	ácidos policarboxílicos	vermelho
	polifenóis	verde ou azul-esverdeado
	lignina	verde ou azul-esverdeado
	amido	vermelho
Reagente de Schiff	polissacarídeos da parede celular	vermelho
	calose	sem coloração
	celulose	sem coloração
	cutículas	preto
Negro Sudão (Sudan black)	suberina	preto
	parede celular	vermelho
	amido	vermelho

No preparo de materiais para o microscópio de transmissão, são utilizados corantes contendo metais pesados, tais como:

- acetato de uranil (uranyl acetate) - os tecidos são colocados em uma solução saturada de acetato de uranil por 20 a 40 min., sendo então lavados com água destilada;
- citrato de chumbo (lead citrate) - os tecidos são colocados em uma solução aquosa a 0,2%, por 1 a 10 min., procurando-se evitar a contaminação com CO<sub>2</sub> pelo uso de hidróxido de sódio (NaOH); após esse período, procede-se à lavagem com água destilada.

Nenhuma técnica preserva a natureza *in vivo* do material estudado, mas deve-se procurar manter a sua estrutura. Para isso, na técnica de microscopia de varredura, deve-se procurar: estabilidade mecânica, remoção ou imobilização da água e o direcionamento dos elétrons. Isso pode ser conseguido pela fixação do material por congelamento, seguida por fixação, desidratação e revestimento. Os procedimentos geralmente incluem: 1- a fixação em glutaraldeído; 2- desidratação em etanol e/ou acetona; 3- emprego do ponto de congelamento crítico; 4- revestimento com um filme de metal pesado, como ouro ou paládio. Certamente os que tiverem acesso a um microscópio eletrônico terão acesso também ao treinamento necessário, por isso não serão dados mais detalhes.

Hoje, existem inúmeras variações e centenas de estudos sobre microscopia óptica e eletrônica, alguns dos quais são citados a seguir:

- imunocitoquímica - consiste do uso de anticorpos marcados que atuam como reagentes específicos, localizando determinados constituintes do tecido (os抗ígenos) *in situ*. Têm sido utilizados em ensaios enzimáticos (peroxidase, fosfatase alcalina), localização de partículas fluorescentes, etc.;
- marcação imunológica com ouro (immunogold labelling) - utiliza partículas de 5 nm a 20 nm de diâmetro, permitindo a visualização em microscópio eletrônico;
- incremento, pela prata, da marcação imunológica com ouro (silver enhancement) - através de uma segunda camada de prata, permite a visualização das partículas do item anterior em microscópio óptico;
- uso de anticorpos monoclonais - uso de anticorpos que reconhecem somente um epitopo (epitope) do antígeno sendo, portanto, bastante específicos. Essa técnica tem sido empregada para reconhecer componentes específicos das bactérias, nódulos, etc.

Mais detalhes sobre os tópicos aqui descritos podem ser obtidos em outros livros, como Gerhardt et al. (1984); Collins et al. (1989) e Ribeiro & Soares (1993).

#### 1.4. Considerações Finais

Antes de iniciar um trabalho em um laboratório de microbiologia, é essencial receber um treinamento sobre os princípios básicos de funcionamento, incluindo segurança, principais equipamentos e técnicas utilizadas. As atividades poderão ser, então, maximizadas, sem oferecer quaisquer riscos a quem as conduz.

## 1.5. Referências Bibliográficas

- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M. **Collins and Lyne's Microbiological Methods**. 6th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1989. 407p.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1984. 524p.
- PHILLIPS, G. B.; MILLEE, W. S. **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 15th ed. Easton: Mack Publishing, 1975. p.1398-1404.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual, bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.