

INTERATIVO CURSO E COLÉGIO

**CONFEÇÃO DE LÂMINAS MICROBIOLÓGICAS A PARTIR DE BIOENSAIOS
ADAPTADOS COMO ESTRATÉGIA METODOLÓGICA PARA EDUCAÇÃO BÁSICA**

**São Carlos, SP
2024**



Bruno Hideki de Riggi

Maressa Pomaro Casali Pereira

**CONFECÇÃO DE LÂMINAS MICROBIOLÓGICAS A PARTIR DE BIOENSAIOS
ADAPTADOS COMO ESTRATÉGIA METODOLÓGICA PARA EDUCAÇÃO
BÁSICA**

Relatório apresentado à 8ª FEMIC - Feira
Mineira de Iniciação Científica.

Orientação da Profa. Maressa Pomaro Casali
Pereira

São Carlos, SP

2024



RESUMO

Por meio da Microbiologia é possível estudar diferentes microrganismos como bactérias e fungos, que podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes e não serem notados pelos seres humanos. Com os estudos de Antony van Leeuwenhoek, que utilizou uma das grandes invenções de Galileu, o microscópio, foi possível um grande avanço na Biologia e uma nova percepção da ciência médica a partir do século XVII. A partir do entendimento de que as pessoas tem percepções equivocadas sobre esse tema, este trabalho teve como objetivo confeccionar lâminas microbiológicas a partir de bioensaios com cultura de microrganismos, a fim de compartilhar a visualização dessas lâminas em feiras do conhecimento e aulas práticas das escolas, com o apoio da Experimentoteca da Universidade de São Paulo, um espaço de investigação que produz material experimental para o apoio das aulas dos professores da educação básica. Para isso, foram feitos bioensaios com microrganismos presentes no ambiente escolar, utilizando placas de Petri esterilizadas e cultura com meio nutritivo previamente fervido. Os materiais utilizados na montagem das placas foram higienizados com detergente e solução aquosa de hipoclorito de sódio ou autoclavados em panela de pressão. As amostras foram coletadas de diversos locais do ambiente escolar. A partir dos bioensaios foram produzidas lâminas de bactérias, por coloração negativa, e de fungos, por cultivo em lâmina. Foram identificadas e classificadas bactérias segundo seu formato: cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos e estreptobacilos, além de fungos comumente encontrados na deterioração dos alimentos: *Fusarium sp.*, *Apergillus niger*, *Penicillium sp.* Um laminário com lâminas de bactérias e fungos foi doado ao CDCC para compor o acervo de empréstimo pelas escolas de São Carlos. Dessa forma, esse trabalho possibilita uma compreensão mais ativa e crítica sobre os conteúdos relacionados à Microbiologia de microrganismos à alunos da educação básica.

Palavras-chave: microrganismos, microcultivo, lâminas.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	6
3 OBJETIVO GERAL	7
4 METODOLOGIA	8
5 RESULTADOS OBTIDOS	13
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
REFERÊNCIAS	15



1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que os microrganismos foram as primeiras formas de vida a surgirem no planeta há bilhões de anos, antes mesmo das plantas e animais. Não é possível sua visualização a olho nu de microrganismos, necessitando-se de um microscópio para visualizá-los (MADIGAN et al., 2010). Quando se fala de sucesso evolutivo em relação ao número de indivíduos, são os seres vivos mais bem-sucedidos, ocupando diversos nichos e se relacionando com a grande maioria dos seres vivos, de forma direta ou indireta. São organismos microscópicos e unicelulares e dentro da classificação dos seres vivos que estão abrigadas no reino Monera (FARIA, et al., 2023).

Há evidências de que as formas mais antigas de vida são fósseis de bactérias datados de 3,5 bilhões de anos. Nas águas primitivas do Arqueano provavelmente viveram minúsculos organismos que degradavam matéria orgânica evidenciando o início a vida, quando os primeiros fósseis de bactérias são registrados (OLIVEIRA, 2006).

Por meio da Microbiologia é possível estudar diferentes os microrganismos como bactérias e fungos, que podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes e não serem notados pelos seres humanos. Com os estudos de Antony van Leeuwenhoek, que utilizou uma das grandes invenções de Galileu, o microscópio, foi possível um grande avanço na Biologia e uma nova percepção da ciência médica a partir do século XVII (ARAGUAIA, 2024). A Microbiologia estuda o papel dos microrganismos no mundo, em objetos, no ambiente, nos alimentos e no corpo humano, sendo o uso do microscópio e da confecção de lâminas indispensáveis para a visualização desses microrganismos (FERREIRA, 2010).

Para que os alunos possam ter motivação nas aulas de Biologia, no Ensino Médio, e Microbiologia, no Ensino Superior, as aulas práticas se tornam fortes aliadas na fixação de um conteúdo, a fim de tornar o ensino mais dinâmico e atrativo, numa proposta de inovação nos currículos escolares (BORGES, 2007).

Os microrganismos podem apresentar tanto efeitos positivos, quanto negativos. Por isso, faz-se necessário seu estudo, tomando consciência de seus riscos e efeitos, a fim de tornar o planeta um local equilibrado e seguro à existência humana.



2 JUSTIFICATIVA

As pessoas podem ter percepções equivocadas a respeito dos microrganismos. Para trazer uma visão mais realista e crítica do mundo microscópico, existe a Microbiologia, a qual estuda o papel de seres vivos e partículas microscópicas encontradas em objetos, meio ambiente, alimentos e no corpo humano (KIMURA et al. 2013).

No entanto, não existe a disciplina de Microbiologia no Ensino Básico. Este tema está inserido de forma mais ampla e teórica nos estudos de citologia e dos seres vivos: bactérias, fungos e protozoários. Porém, quase nunca existem aulas práticas sobre esse tema nas escolas para contribuir com as aulas teóricas e esclarecer as dúvidas em relação aos micróbios e sua atuação em relação aos benefícios e malefícios que trazem a saúde humana e ambiental, inclusive seu papel na ciclagem da matéria orgânica.

A fim de trazer uma maior motivação às aulas de Biologia, no Ensino Médio, as aulas práticas se tornam fortes aliadas na fixação de um conteúdo, a fim de tornar o ensino mais dinâmico e atrativo, numa proposta de inovação nos currículos escolares (BORGES, 2007).

Assim, as escolas e podem relacionar a Microbiologia com assuntos do cotidiano, para que a metodologia de ensino se torne cada vez mais compreensível e o aluno perceba a razão pela qual é necessário ter conhecimento sobre seres tão pequenos como os micróbios.

O projeto sobre os bioensaios com microrganismos bactérias e fungos, e a motivação de prosseguir com a confecção de lâminas microbiológicas, surgiu a partir de aulas teóricas de Biologia sobre esses seres vivos e a necessidade em desenvolver algo prático e significativo para os colegas de sala e para os demais estudantes do Ensino Médio da cidade de São Carlos.

Além disso, a parceria com institutos de pesquisa como o CDCC (Centro de Divulgação Científica e Cultural da USP/São Carlos) foi essencial para reafirmar a importância e aplicação do trabalho, já que esse centro se preza a oferecer material didático como apoio às aulas das áreas de ciências da natureza e matemática para todas as escolas do município de São Carlos e região. Através deste projeto, O CDCC, além de emprestar materiais para os ensaios microbiológicos e confecção de lâminas, pode proporcionar à sociedade a oportunidade de oferecer conhecimento prático por meio da visualização das lâminas confeccionadas, validando a importância desse setor da Universidade



de São Paulo na divulgação científica para a sociedade, já que a ciência e a cultura são bens de todos; não devendo estar restritos apenas a um grupo seletivo de alunos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal confeccionar lâminas microbiológicas a partir de bioensaios com cultura de microrganismos presentes em diferentes locais do ambiente escolar, como: digital da catraca do colégio, tela do celular dos alunos, forno micro-ondas do colégio, frutas não lavadas dos alunos, chorume da composteira da aula prática de Biologia. O intuito principal da montagem das lâminas foi compartilhar sua visualização em feiras do conhecimento e aulas práticas das escolas de São Carlos, com o apoio da Experimentoteca da Universidade de São Paulo, por meio do empréstimo de materiais.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho consistiram em:

- Analisar o crescimento bacteriano através das amostras de ambientes variados, utilizando a técnica *Spread Plate*, com adaptação dos meios de cultivo e protocolos de higienização do ambiente escolar;
- Proceder a montagem de lâminas de bactérias e fungos a partir dos organismos cultivados nos bioensaios, utilizando técnicas microbiológicas;
- Fazer a divulgação do tema “Microrganismos presentes no ambiente escolar”, possibilitando a visualização do laminário de microrganismos, na feira do conhecimento realizada na unidade escolar;
- Oferecer um laminário categorizado e identificado à Experimentoteca do Centro de Divulgação Científica e Cultural da USP de São Carlos, a fim de promover a democratização



do ensino sobre os microrganismos e sua visualização, nas escolas públicas e privadas de São Carlos.

As hipóteses levantadas para esse projeto foram:

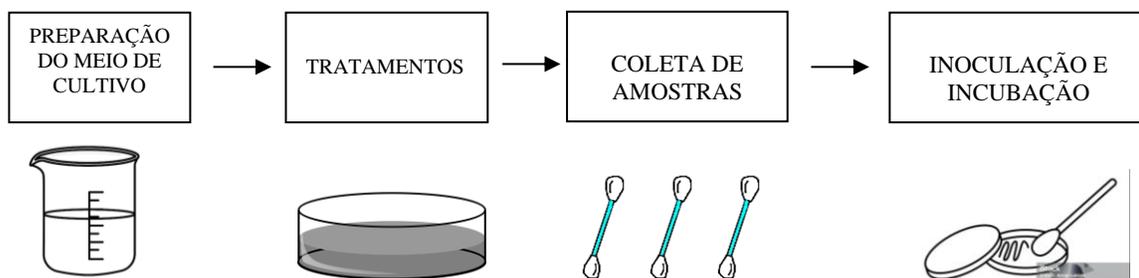
- Como as bactérias de lugares comuns ao toque irão se desenvolver?
- É possível adaptar meios de cultivo sintéticos e caros para laboratórios de ensino de Ciências e Biologia da educação básica e assim confeccionar lâminas microbiológicas?

4 METODOLOGIA

O trabalho faz parte de um projeto maior desenvolvido por uma equipe de alunos e a presente orientadora, sobre "Crescimento de microrganismos em meio de cultivo adaptado e processos de desinfecção". No entanto, a confecção de lâminas, categorização e identificação das mesmas foi feita apenas pelo aluno do presente trabalho submetido à Femic.

Imagens das de amostras coletadas para e a montagem do laminário podem ser identificadas abaixo, nas Figuras 1.

Figura 1: Procedimentos prévios utilizados para obtenção de lâminas de microscopia.



Fonte: próprio autor.

A pesquisa iniciou-se com o cultivo de bactérias e pela análise de como elas se desenvolvem em um meio de cultivo a partir de água destilada, gelatina, caldo de carne e açúcar. Os protocolos usados foram adaptados para o ambiente escolar, bem como o meio de cultivo, pela falta de materiais e vidrarias, elevado custo de alguns meios de cultivo padrão e liquefação do meio de cultivo, dependendo da concentração dos microrganismos administrados em cada tratamento. Além disso



foi necessário driblar a dificuldade em controlar a temperatura ambiente dos experimentos sem usufruir de uma incubadora com temperatura controlada.

Inicialmente, foram consultadas diferentes referências, da área de bioensaios e microbiologia, com o intuito de obter um referencial teórico para o desenvolvimento da pesquisa. Na sequência, foram feitos alguns ensaios microbiológicos, no laboratório ensino da escola, utilizando protocolo adaptado.

O experimento se deu através de diversos passos, adaptando os procedimentos de cultura bacteriana a cada bioensaio. Durante todo o processo, foram utilizados EPI's de proteção como: jaleco, máscara e luvas descartáveis, a fim de evitar a contaminação.

Figura 2: Aluno utilizando EPI durante a fabricação do meio de cultivo.



Lavagem de vidrarias

Inicialmente, todos os materiais e vidrarias a serem utilizados foram lavados com detergente em concentração de 2%, enxaguados com água de torneira e colocados em uma caixa com água, pelo menos por uma hora, e ácido hipoclorídrico em concentração de 10%. Por fim, as vidrarias passaram pelo enxágue de 7 vezes em água de torneira e 3 vezes em água destilada. Todo o processo ocorreu em um ambiente esterilizado com álcool 70% e uso de EPI's. Todas as superfícies ou bancadas de apoio também foram esterilizadas. Esse protocolo de assepsia foi adaptado a partir de protocolos NBR para teste de toxicidade, sugeridos pela orientadora do projeto (ABNT, 2009; ABNT, 2021).



Meio de Cultivo

O meio de cultivo adaptado foi feito com caldo de carne (5 tabletes), açúcar (5 colheres de sopa) e água destilada (1 L) e autoclavado em uma panela de pressão. No laboratório, o meio foi fervido por 15 minutos, e a ele acrescentou-se gelatina incolor para dar consistência. Após incluir a gelatina ao meio fervido, este foi despejado em placas de petri esterilizadas, cada uma contendo aproximadamente 25mL. A gelatina foi utilizada como ingrediente solubilizante do meio de cultivo. Para cada 100 mL de meio foi foram adicionados 24g de gelatina incolor. Sempre foi mantida uma lamparina acesa próxima ao meio a fim de criar uma zona estéril. As placas de petri foram colocadas em uma geladeira para que o meio fosse solidificado durante 20 minutos. Todos os procedimentos produção do meio de cultivo pode ser identificados abaixo, nas Figura 3.

Figura 3: Aquecimento e montagem do meio de cultivo, com gelatina, caldo de carne e açúcar.



Coleta de amostras

Por fim, foram coletadas as amostras de diversos locais do ambiente escolar: digital da catraca do colégio, tela do celular dos alunos, forno micro-ondas do colégio, frutas não lavadas dos alunos, composteira escolar. As amostras foram coletadas com o auxílio de cotonetes e inoculadas nas placas de Petri, preparadas anteriormente, com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril ou o próprio cotonete da coleta. Foram utilizados 3 cotonetes para cada coleta. Da composteira escolar foi coletado o chorume concentrado. Este foi diluído e espalhado em placas de Petri, preparadas com o meio de cultivo, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Todos os tratamentos, dispostos nas placas de Petri contaminadas, inclusive o tratamento Controle, foram incubados em uma caixa de isopor de 20 L, que ajudou a manter a temperatura ambiente, aproximadamente 30°C, mais estável. À caixa



de isopor foi acoplado um termômetro para controle da temperatura diariamente, por 3 a 5 dias, dependendo do bioensaio. Todos os procedimentos da coleta e inoculação de amostras podem ser identificados na Figura 4.

Figura 4: Inoculação de amostras de microrganismos em meios de cultivo a base de gelatina, caldo de carne, açúcar e água destilada.



As lâminas de bactérias e fungos foram feitas após a finalização do experimento final, realizado no laboratório de química do CDCC/USP. Foram retiradas alíquotas de cada amostras, as quais foram submetidas a duas técnicas distintas de fixação de lâminas: coloração negativa com corante Nigrosina e cultivo em lâmina para montagem de lâminas de fungos. Tamanho e forma das bactérias A maioria das bactérias varia de 0,2 a 2,0 μ m de diâmetro e de 2 a 8 μ m de comprimento. Tradicionalmente são descritas três formas básicas das bactérias: coco (esférico), bacilo (em forma de bastão) e espirilo

Para proceder a montagem de lâminas de microbiologia foram utilizadas duas técnicas distintas: coloração negativa com Nigrosina à 10 % para a visualização das bactérias e cultivo em lâmina para a visualização de fungos.

A bacterioscopia corada foi realizada em esfregaços de amostras, que, uma vez secos e fixados, foram submetidos a um método de coloração. Neste caso as bactérias mortas foram examinadas. Essas foram provenientes a partir de um esfregaço, que consiste em espalhar na superfície de uma lâmina de vidro uma suspensão bacteriana obtida de uma cultura em meio líquido ou meio sólido. Portanto, foi utilizado um método de coloração simples, do tipo negativa, onde a bactéria não foi corada, mas a sua célula contrastou com o corante circundante. Após a execução do



esfregaço, a lâmina foi passada por três vezes sob a chama da lamparina. Então foi feita a fixação, do esfregaço na lâmina, com o corante.

Já às lâminas de fungos foi adicionada uma pequena alíquota do meio de cultivo e as hifas e esporos do fungo coletado em cada amostra. A lamínula ajustada acima da amostra foi vedada com base transparente para unhas. As hifas do fungo continuaram a crescer na lâmina vedada até estabilização.

As lâminas de bactérias foram classificadas quanto ao seu formato segundo a Figura 5. As lâminas que continham os fungos foram classificadas segundo manuais de aulas práticas de Microbiologia, cedidos pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de São Carlos (UFSCar)

Figura 5: Desenhos da forma e arranjos bacterianos.

PRINCIPAIS TIPOS MORFOLÓGICOS BACTERIANOS		TIPOS DE ARRANJOS			
BÁSICOS	SECUNDÁRIOS				
 COCO GRAM NEGATIVO	 COCO GRAM NEGATIVO RENIFORME	 DIPLOCOCOS Ex. <i>Neisseria</i> sp.	 Ex. <i>Micrococcus</i> sp.	 Ex. <i>S. pneumoniae</i>	
 COCO GRAM POSITIVO	 COCO GRAM POSITIVO LANCEOLADO	 ESTAFILOCOCO Ex. <i>Staphylococcus</i> sp.	 TÉTRADE Ex. <i>Gafrica</i> sp.	 ESTREPTOCOCO Ex. <i>Streptococcus</i> sp.	 SARCINA Ex. <i>Sarcina</i> sp.
 BACILO GRAM NEGATIVO	 BACILO GRAM NEGATIVO FUSIFORME	 ESTREPTOBACILO Ex. <i>Haemophilus ducreyi</i>	 PALIÇADA Ex. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	 SEM ARRANJO Ex. <i>Bacillus</i> sp.	 SEM ARRANJO Ex. Enterobactérias – <i>Proteus</i> sp.; <i>Escherichia</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.
 BACILO GRAM POSITIVO	 BACILO GRAM POSITIVO LANCEOLADO	SEM ARRANJO CARACTERÍSTICO			
 BACTÉRIAS FILAMENTOSAS GRAM LÁBEIS Ex. <i>Nocardia</i> sp.		SEM ARRANJO CARACTERÍSTICO			
 ESPIRILADOS (NÃO SE CORAM AO GRAM) Ex. <i>Treponema</i> sp.; <i>Borrelia</i> sp.					

Fonte: Moreira, 2015.



5 RESULTADOS OBTIDOS

O crescimento bacteriano e fúngico foi potencializado pelas altas temperaturas (por volta dos 30-35°C) e pela incubação de 5 dias, causando liquefação dos meios de cultivo por ação das bactérias. Assim que foi notado o derretimento dos meios, foram colocados na geladeira para voltarem a fase sólida como foi feito para a solidificação inicial. No entanto, os meios não voltaram a se solidificar, comprovando que as bactérias e fungos transformaram a matéria orgânica em inorgânica, usando como referência o controle, onde não houve crescimento de colônias e o meio se manteve sólido. Por isso, foram feitos vários bioensaios com ajustes na metodologia a cada novo experimento (Figura 6).

Figura 6: Placas de Petri com grupo controle e tratamentos com colônias circulares de fungos. Cultivo em lâminas de fungos: Placas de Petri com grupo controle (A) e colônias circulares de fungos (B). Cultivo em Lâminas de fungos (C): *Penicillium digitatum* 1; *Penicillium sp.*2; *Fusarium sp.*3; *Aspergillus niger* 4; Hifas branca cenocítica 5.

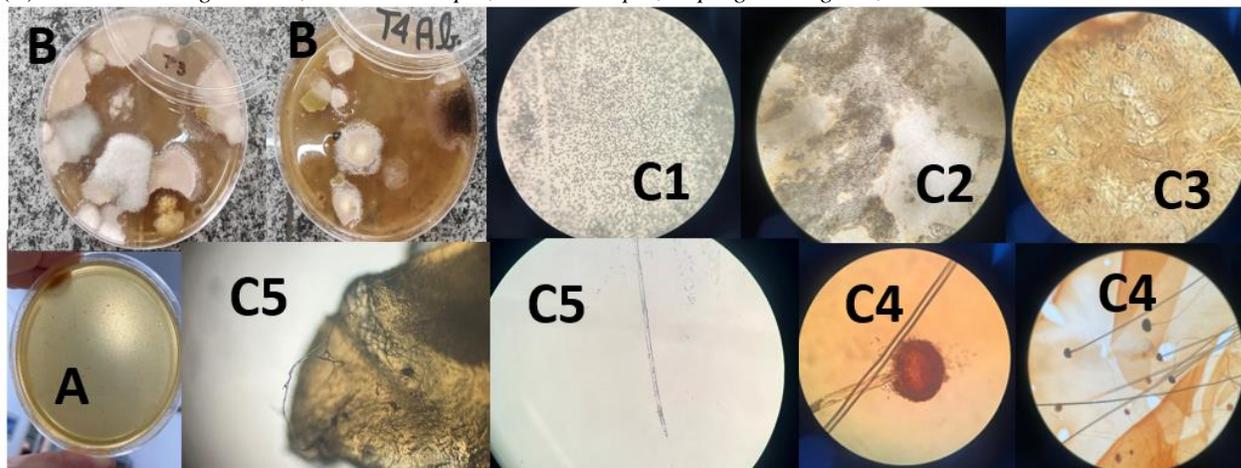


Figura 7: Lâminas bacteriológicas com diferentes formas de bactérias (cocos, diplococos, estafilococos, estreptococos, estreptobacilos e bacilos).



Em um último ensaio bacteriológico, realizado no laboratório de química do CDCC, foi possível obter melhores resultados para a solidificação dos meios de cultivo, permitindo o



crescimento bacteriano de modo mais visível, a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e a separação de alíquotas (amostras) das placas de Petri para a montagem de lâminas microbiológicas de bactérias e fungos. Foram identificadas e classificadas bactérias segundo seu formato: cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos e estreptobacilos. Foram identificados alguns gêneros de fungos comumente encontrados na deterioração dos alimentos: *Fusarium sp.*, *Apergillus niger*, *Penicillium sp.*, além de uma espécie não identificada de um fungo, porém composto por hifas cenocíticas de coloração branca. Um laminário com lâminas de bactérias e fungos foi doado ao CDCC para compor o acervo de empréstimo pelas escolas de São Carlos. Portanto, foi possível comprovar a adaptação do protocolo criado para o meio de cultivo em laboratório de ensino, além de promover a montagem de um laminário destinado ao CDCC, a partir do cultivo de fungos e bactérias que cresceram no meio de cultivo do bioensaio final (Figuras 6 e 7).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultivo caseiro utilizado foi considerado viável diante da adaptação do protocolo para cultivo de bactérias em laboratório de ensino, podendo ser ponto de partida para a confecção de lâminas de bactérias e fungos. Portanto, a partir dos bioensaios foram produzidas lâminas de bactérias, por coloração negativa com Nigrosina, e de fungos, por cultivo em lâmina. Foram identificadas e classificadas bactérias segundo seu formato: Foram identificadas e classificadas bactérias segundo seu formato: cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos e estreptobacilos. Foram identificados alguns gêneros de fungos comumente encontrados na deterioração dos alimentos. Um laminário com lâminas de bactérias e fungos foi doado ao CDCC para compor o acervo de empréstimo pelas escolas de São Carlos.

Dessa forma, esse trabalho possibilita uma compreensão mais ativa e crítica sobre os conteúdos relacionados à Microbiologia de microrganismos à alunos da educação básica.



REFERÊNCIAS

- ARAGUAIA, Mariana. Anton Leeuwenhoek; *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/anton-leeuwenhoek.htm>. Acesso em 21 de outubro de 2024.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda–método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15469: Ecotoxicologia - Coleta, Preservação e Preparo de Amostras. 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15411-3: Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri* - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. 2021.
- BORGES, R. M. R.; LIMA, V. M. do R. Tendências contemporâneas do ensino de biologia no Brasil. **Revista Eletrônica de Enseñanza de las Ciencias**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2007.
- FARIA, Lays Gonçalves; DE ARAÚJO, Rafael Fachim; PEREIRA, Juliana Borges. Confecção de lâminas microbiológicas como estratégia metodológica no ensino de Educação Básica e Superior. **Perquirere**, v. 20, n. 3, p. 37-48, 2023.
- FERREIRA, Andréa Fonseca. A importância da microbiologia na escola: uma abordagem no Ensino Médio. **Monografia (Graduação), curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro–RJ**, p. 69, 2010.
- KIMURA, A. H. *et al.* Microbiologia para o Ensino Médio e Técnico: contribuição da

Confecção de lâminas microbiológicas a partir de bioensaios adaptados como estratégia metodológica para Educação Básica



extensão ao ensino e aplicação da ciência. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 254-267, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MOREIRA, José Luciano Bezerra Visualização bacteriana e colorações / José Luciano Bezerra Moreira, Cibele Barreto Mano de Carvalho, Cristiane Cunha Frota - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015. 68 p. : il. ; 21 cm. (Estudos da Pós-Graduação)

OLIVEIRA, Jeferson Botelho de. **O Tempo Geológico no Ensino Fundamental e Médio: os estudantes e os livros didáticos**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.