



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Instituto de Biociências – IBB

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Disciplina de Microbiologia Veterinária



ROTEIROS PARA AS AULAS PRÁTICAS

CICLO DE BACTERIOLOGIA

– MEDICINA VETERINÁRIA –

Aluno (a): _____

Botucatu –2012

INFORMAÇÕES GERAIS

1. Durante a permanência no laboratório de aulas práticas, é necessário o uso de avental. **Encerradas as atividades, o mesmo deve ser guardado em uma sacola ou saco plástico, de modo a evitar possível contaminação do ambiente fora do laboratório.**
2. Não deixe seus pertences sobre as mesas onde os trabalhos práticos são realizados.
3. Comunique imediatamente aos instrutores qualquer acidente (derramamento de culturas sobre a bancada ou chão, ferimentos de qualquer espécie, aspirações de culturas na boca, etc.).
4. Coloque sempre nos recipientes indicados o material contaminado.
5. **Lave bem as mãos com desinfetante antes de deixar o laboratório.**
6. Não é permitido o uso de chinelo, sandália ou qualquer outro calçado que deixe os pés expostos.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS COMUMENTE UTILIZADOS EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA

1. Alça e agulha de platina
2. Bico de Bunsen
3. Placas de Petri e tubos de ensaio
4. Meios de cultura
5. Solução salina estéril
6. Pipetas e pipetas Pasteur, zaragatoas ("swabs")
7. Lâminas e lamínulas para microscopia
8. Corantes
9. Microscópio
10. Estufa
11. Banho-maria
12. Autoclave
13. Forno Pasteur

CUIDADOS PARA SE EVITAR CONTAMINAÇÃO DE CULTURAS

- 1) A alça e agulha de platina devem ser flambadas, isto é, aquecidas na chama do bico de Bunsen até se tornarem vermelhas, antes e depois de qualquer procedimento de semeadura. A flambagem é mais facilmente e eficientemente conseguida mantendo-se a agulha ou alça num ângulo de 45° em relação à mesa de trabalho. Antes da coleta do material, deve-se resfriar o instrumento, na parede do tubo, no próprio meio estéril, ou simplesmente aguardando o seu desaquecimento natural por alguns segundos.
- 2) Em relação às sementeiras procedidas em tubos de ensaio, exige-se flambar a boca dos mesmos após a retirada e antes da colocação do tampão de algodão. O tampão de algodão deve ser segurado pelo dedo mínimo da mão oposta à que segura o tubo e nunca deixado sobre a bancada.
- 3) As pipetas são previamente esterilizadas e embrulhadas em papel. Para sua utilização e ao mesmo tempo evitar que se contaminem, deve-se torcer o papel na região central da pipeta, retirar primeiramente a parte superior do papel e depois a inferior (ponta da pipeta). Depois de utilizada, a pipeta deverá ser colocada dentro de um recipiente apropriado, contendo solução desinfetante.
- 4) Todo recipiente (placas de Petri ou tubos de ensaio) com cultura ou meio estéril deverá ser manuseado com cuidado de modo a não ficarem abertos e expostos ao ambiente. Com esta medida e mais a exigência de abri-los somente próximo ao bico de Bunsen em tempo suficiente para a semeadura, colheita do material ou simples inspeção, será evitada a sua contaminação por microrganismos do ar. Uma vez semeados, devem ser incubados em estufa. As placas de Petri devem ser envolvidas por filme plástico (tipo Magipack) antes de ser colocadas na estufa e devem permanecer com as tampas voltadas para baixo.

OBSERVAÇÃO DE LÂMINAS AO MICROSCÓPIO

Nos exercícios de:

⇒ **bacteriologia**, as lâminas contendo esfregaços de material fixado e corado sempre serão observadas através de objetiva de imersão;

⇒ **micologia**, em geral as lâminas são inicialmente observadas no menor aumento e a seguir nos aumentos maiores (até 40X), sem necessariamente empregar a objetiva de imersão. As lâminas de esfregaços de levedura são examinadas como em bacteriologia.

Após a observação das lâminas de esfregaços, estas deverão ser colocadas em recipiente com detergente, especificamente destinado a este fim. As lâminas permanentes deverão ser deixadas sobre a bancada.

Depois de utilizados, os microscópios deverão ser limpos e devidamente guardados.

CICLO DE BACTERIOLOGIA

PRÁTICA 1 - MORFOLOGIA E COLORAÇÃO DAS BACTÉRIAS

I - Morfologia

1. As bactérias de um modo geral, apresentam-se sob a forma de:

- a) cocos: células esféricas,
- b) bacilos: células cilíndricas, em formas de bastonetes,
- c) espirilos: células espiraladas, d) vibriões

Estas formas básicas estão sujeitas a variações, caso em que são denominadas de formas pleomórficas ou formas de involução.

2. Agrupamentos

Segundo o (s) plano (s) de divisão celular e a disposição das células entre si, as bactérias podem apresentar-se em agrupamentos:

- a) diplococos , b) estafilococos, c) estreptococos, d) estreptobacilos

II - Coloração

1. Coloração de Gram

Este método de coloração permite a classificação das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas:

Gram positivas: são bactérias que não se deixam descorar quando submetidas à ação de solventes orgânicos (álcool, éter, etc.) e permanecem com a cor do cristal violeta.

☞ Bactérias Gram positivas → cor azul

Gram negativas: São, portanto, aquelas que se deixam descorar pelo solvente orgânico tomando a cor do corante de contraste (safranina ou fucsina).

☞ Bactérias Gram negativas → cor vermelha

2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Constitui um método específico para a coloração das micobactérias (ex.: bacilo de Hansen e bacilo da tuberculose). Tais bactérias se caracterizam por resistirem à descoloração por uma mistura de álcool-ácido clorídrico, depois de tratadas com fucsina fenicada e azul de metileno, permanecendo com a cor da primeiro corante. Por apresentarem esta propriedade, estas bactérias são denominadas *bacilos álcool ácido resistentes* (BAAR).

☞ B.A.A.R → cor vermelha

EXERCÍCIOS

A) Coloração pelo Método de Gram

Material

- Lâmina com esfregaço bacteriano da cultura A
- Bateria de Gram: violeta genciana, lugol, álcool, fucsina

Técnica

1. Cobrir o esfregaço bacteriano com violeta genciana e aguardar um minuto.
2. Escorrer a violeta genciana e cobrir os esfregaços com lugol. Esperar 1 minuto.
5. Escorrer o lugol e descorar os esfregaços pelo álcool. Para isto, deixe o álcool cair, gota a gota, sobre a lâmina, mantendo-a inclinada. Considerar os esfregaços suficientemente descorados quando o álcool não mais retirar o corante dos mesmos.
6. Lavar a lâmina em água corrente.
7. Cobrir os esfregaços com a solução de fucsina, esperar de 30 segundos a 1 minuto.
8. Lavar a lâmina em água corrente. Secar com auxílio de papel de filtro.
9. Observar ao microscópio e desenhar as lâminas das culturas A, B, C e D.

OBS: o esfregaço da Cultura A foi preparado conforme a seguir:

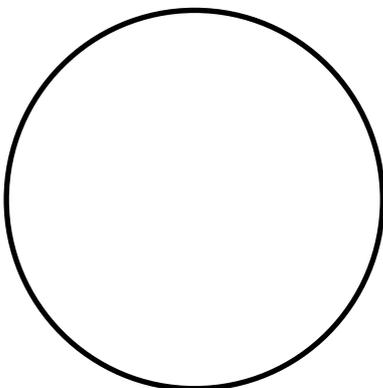
- Com o auxílio da alça de platina, fazer esfregaços bem finos sobre a lâmina de microscopia. Esperar secar.
- Fixar os esfregaços, passando a lâmina três vezes sobre a chama do bico de Bunsen.
- Deixar a lâmina esfriar para seguir com a coloração de Gram.

Desenhos:

Lâmina A

Forma: _____

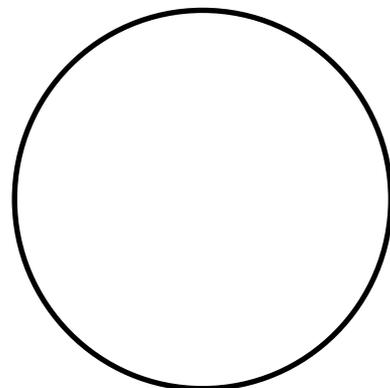
Gram: _____



Lâmina B

Forma: _____

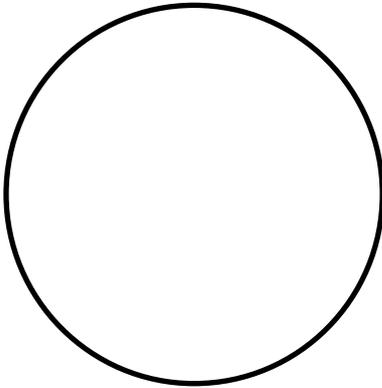
Gram: _____



Lâmina C

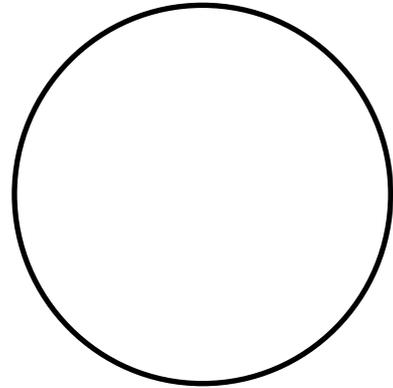
Forma: _____

Gram: _____

**Lâmina D**

Forma: _____

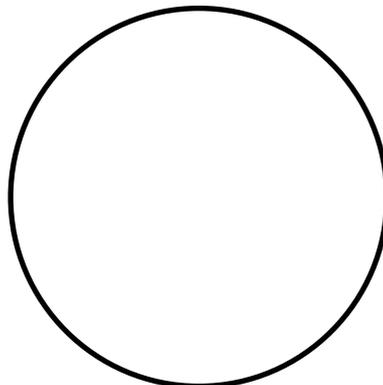
Gram: _____

**B) Coloração de Bactérias pelo Método de Ziehl-Neelsen***Material*

- Lâmina de microscopia contendo esfregaço de escarro
- Bateria de Ziehl-Neelsen: fucsina fenicada, álcool-ácido e azul de metileno.

Técnica

1. Cobrir a lâmina com fucsina fenicada. Com auxílio do bico de Bunsen, aquecer a preparação até a emissão de vapores. Manter o aquecimento durante 5 minutos. Não deixar a fucsina ferver ou secar.
2. Escorrer a fucsina e descorar completamente pelo álcool-ácido.
3. Lavar em água corrente.
4. Cobrir o esfregaço com a solução de azul de metileno. Esperar entre 30 segundos a 1 minuto.
5. Lavar em água corrente e secar com papel de filtro.
6. Observar ao microscópio e desenhar.



PRÁTICA 2 – ESTRUTURA DA CÉLULA BACTERIANA

a) *Estruturas externas*

- Flagelos
- Fímbrias ou pili
- Cápsula
- Parede celular
- Membrana citoplasmática

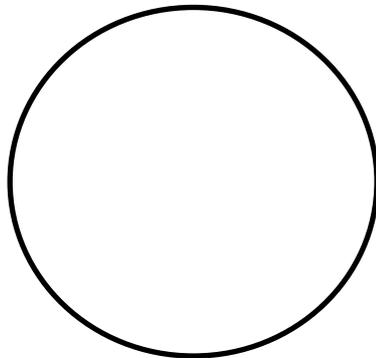
b) *Estruturas internas*

- Esporo
- Mesossomos
- Ribossomos
- Cromossomos
- Grânulos de reserva
- Plasmídios

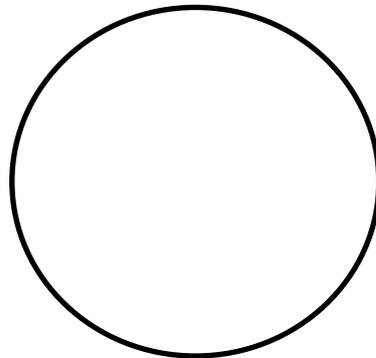
EXERCÍCIO

Demonstração de algumas estruturas da célula bacteriana.

Observar lâminas previamente preparadas das seguintes estruturas da célula bacteriana: cápsula e esporos. Desenhar.



CÁPSULA



ESPOROS

PRÁTICA 3 - MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES FÍSICAS DE CULTIVO BACTERIANO

A) Meios de Cultura

Para o cultivo e identificação das bactérias são utilizadas soluções e substâncias nutritivas, denominadas *meios de cultura* que podem ser classificados com base na sua constituição, ou seja, quanto às substâncias nutritivas que os compõem, quanto ao seu estado físico e quanto à capacidade seletiva e diferencial que apresentam.

Quanto às Substâncias Nutritivas:

1. *Meios Sintéticos*: quando as substâncias que os compõem são quimicamente definidas e a concentração e características de cada ingrediente são conhecidas com exatidão.
2. *Meios Simples*: quando constituídos somente de substâncias essenciais para o crescimento de algumas bactérias.
3. *Meios Complexos*: quando se adicionam ao meio simples, substâncias orgânicas complexas.

Quanto ao Estado Físico:

1. Meios Líquidos: também denominados caldos.
2. Meios Sólidos: quando se adiciona ao caldo 1,5% a 2% de ágar.
3. Meios Semi-sólidos: quando se adiciona ágar ao caldo, na concentração igual ou menor que 0,5%.

Quanto à capacidade seletiva e diferencial:

1. **Meios Enriquecidos**: são meios simples adicionados de certas substâncias como soro, sangue, extrato de levedura, etc. Estes meios servem para o cultivo de bactérias que necessitam de substratos complexos. Ex: meios de ágar sangue, de ágar chocolate, de ágar soro, etc.
2. **Meios Seletivos**: são meios de cultura contendo substâncias que impedem o crescimento de certas bactérias sem inibir o crescimento de outras. Ex: Meios de MacConkey, de Tetracionato, de Verde Brilhante, etc.
3. **Meios Diferenciais**: são aqueles que contêm substâncias que, quando utilizadas, indicam certas características da bactéria. Ex: a) O sangue quando adicionado ao meio de cultura, indica se uma bactéria é hemolítica ou não. Nesse caso, o meio além de enriquecido é também diferencial. Ex: meio de ágar-sangue. b) A lactose quando adicionada ao meio juntamente com um indicador de pH, permite distinguir as bactérias que fermentam esse açúcar das que não o fermentam. Ex: meio de MacConkey.
4. **Meios de Enriquecimento**: são aqueles que inibem o crescimento de certas bactérias, porém favorecem o crescimento de outras. Ex: meios de tetracionato e de selenito permitem maior crescimento de bactérias do gênero *Salmonella*.
5. Além desses, existem outros meios de cultura, como por exemplo meios para conservação de bactérias, meios para a contagem do número de bactérias, etc.

B) Condições Físicas de Cultivo

Além do meio de cultura, outros fatores devem ser levados em consideração para o cultivo de bactérias, tais como:

1. *pH do meio de cultura*: deve ser geralmente em torno de 7.
2. Temperatura de crescimento: geralmente 37°C

Quando as bactérias crescem em temperaturas baixas (10 a 20°C) são denominadas de psicrófilas.

Quando as bactérias crescem em temperaturas médias (20 a 40°C) são denominadas de mesófilas.

Quando as bactérias crescem em temperaturas mais altas (50 a 60°C) são denominadas termófilas.

3. Teor de Oxigênio:

a) *Bactérias aeróbias estritas*: são aquelas que só crescem na presença de oxigênio.

b) *Bactérias anaeróbias estritas*: crescem somente na ausência de oxigênio.

c) *Bactérias anaeróbias facultativas*: crescem tanto na presença como na ausência de oxigênio.

d) *Bactérias microaerófilas*: crescem somente em atmosfera com baixo teor de oxigênio.

EXERCÍCIOS

A) Necessidades nutritivas de algumas bactérias

Material

- Cultura A
- Cultura B
- Cultura C
- Caldo sintético
- Caldo comum
- Caldo glicosado (caldo comum mais glicose)
- Alça de platina

Técnica

1. Semear cada uma das 3 culturas bacterianas nos diferentes meios.
2. Deixar na estufa a 37°C até o dia seguinte.
3. Verificar a presença de crescimento (turvação do meio).
4. Anotar os resultados.

Cultura	Crescimento em		
	caldo sintético	caldo comum	caldo glicosado
A			
B			
C			

B) Dependência do oxigênio para o crescimento bacteriano

Material

- Meio de Tiogel
- Caldo simples
- Culturas A, D e F
- Pipeta Pasteur
- Alça de platina

Técnica

Com a pipeta Pasteur, semear cada uma das culturas em tubos de tiogel. Em seguida, semear a cultura F, com alça de platina, em caldo simples. Colocar todos os tubos na estufa. No dia seguinte, observar os tubos, verificando, no meio de tiogel, a localização do crescimento e, no caldo simples, se houve ou não crescimento.

Culturas	Crescimento no caldo simples	Local de crescimento no meio de tiogel		
		Superfície	Toda extensão do Meio	Base do Meio
A				
D				
F				

PRÁTICA 4 - ALGUMAS ATIVIDADES BIOQUÍMICAS DAS BACTÉRIAS e MOVIMENTO BACTERIANO

Depois de estudarmos a forma, coloração, necessidades nutritivas e outras características (temperatura ótima de crescimento, relação com o oxigênio, etc.) de uma bactéria, torna-se necessário conhecer as suas atividades bioquímicas para que possamos determinar a família, gênero ou espécie da bactéria em estudo. Os métodos utilizados para este fim são qualitativos e variam de acordo com o tipo de atividade que se pretende pesquisar. Estudaremos aqui alguns dos métodos de interesse geral, deixando para o momento oportuno aqueles específicos para determinados grupos de bactérias.

De modo geral, quando estudamos as atividades bioquímicas de uma bactéria, procuramos verificar, também, se ela é móvel ou imóvel, o que podemos fazer pela observação do seu tipo de crescimento em ágar semi-sólido. Já vimos que o movimento da maioria das bactérias depende de seus flagelos, e a verificação da presença destas estruturas, indiretamente feita pela prova de motilidade, é bastante importante para a sua identificação.

EXERCÍCIOS

A) Pesquisa da Catalase

Princípio

A catalase é uma enzima produzida por certas bactérias, que desdobra a água oxigenada (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Para pesquisá-la, basta colocar algumas gotas de água oxigenada sobre a cultura. Estando a catalase presente, haverá o desprendimento de bolhas, indicando a presença de oxigênio no meio.

Material

- Cultura A em caldo
- Cultura B em caldo
- Água oxigenada a 10%

Técnica

Colocar na cultura A algumas gotas de água oxigenada e verificar se há ou não aparecimento de bolhas . Anotar os resultados e fazer o mesmo com a cultura B.

	Cultura A	Cultura B
Catalase		
Gênero		

B) Pesquisa de Citocromo-oxidase*Princípio*

A citocromo-oxidase é a enzima que oxida o citocromo C. A presença do citocromo C é demonstrada tratando-se a cultura com uma solução de *p*-fenileno-diamina. Quando presente, a *p*-fenileno-diamina é oxidada e há o surgimento de cor vermelha que muda gradativamente para azul, pelo contato com a luz. Quando ausente, a cor do crescimento não se altera.

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura D em ágar inclinado
- Papel de filtro
- *p*-fenileno-diamina (solução aquosa a 1%)
- alça de platina

Técnica

1. Com a alça de platina, retire um pouco do crescimento da cultura C e coloque sobre o papel de filtro. Faça o mesmo com a cultura D, em outro ponto do papel.
2. Coloque uma gota da solução de *p*-fenileno-diamina em cada uma das culturas
3. Observe a ocorrência de variação de cor nas duas culturas. O aparecimento da cor vermelha indica a presença de citocromo-oxidase.

	Cultura C	Cultura D
Oxidase		
Gênero		

C) Prova da Oxidação e Fermentação

Princípio

O meio de cultura para esta prova contém glicose e o indicador azul de bromotimol. Inocula-se a bactéria em dois tubos, cobrindo-se a superfície do meio, de um dos tubos, com uma camada de óleo mineral. A bactéria que oxida, mas não fermenta a glicose, acidifica (torna o meio amarelo) apenas no tubo que não contém óleo (tipo respiratório O). A bactéria que fermenta e oxida, acidifica o meio de cultura nos dois tubos (tipo respiratório OF).

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura D em ágar inclinado
- 04 tubos de meio de cultura para a prova OF
- Agulhas de platina
- Óleo mineral
- Pipeta

Técnica

1. Inocule, por picada, dois tubos do meio com cada uma das culturas.
2. Com assepsia e com o auxílio de uma pipeta, coloque uma camada de óleo mineral, de mais ou menos 5 mm de espessura, sobre um dos tubos.
3. Incube os tubos a 37° C até o dia seguinte. Verificar a cor do meio em cada um dos tubos e anotar os resultados.

	Acidificação nos tubos		Tipo respiratório	Gênero
	c/ óleo	sem óleo		
Cultura C				
Cultura D				

D) Fermentação de Açúcares

Princípio

As bactérias variam na sua capacidade de fermentar os açúcares, ou seja, alguns grupos bacterianos são fermentadores e outros não fermentadores destes carboidratos. Além disto, ao fermentá-los, produzem ácidos e gás ou somente ácidos. Esta variabilidade é de grande importância na identificação das mesmas. Para se demonstrar a produção de ácido, basta adicionar o açúcar desejado ao meio de cultura e um corante que indique variação de pH, através de mudança de coloração do meio. Quando também se deseja verificar a produção de gás, coloca-se no tubo de meio de cultura, um tubinho de vidro em posição invertida (tubo de Durham), que retém o gás liberado pela bactéria.

Nesta aula prática, verificaremos a ação de algumas bactérias sobre a glicose e lactose. Entretanto, a mesma técnica pode ser usada para qualquer açúcar (sacarose, salicina, maltose, etc) ou álcool (manitol, adonitol, etc).

Em algumas ocasiões é importante saber-se qual o tipo de fermentação que a bactéria é capaz de fazer com a glicose: se ácida mista ou butilenoglicólica. A pesquisa destes dois tipos de fermentação é feita através de duas provas fundamentais: prova de vermelho de metila (VM) e a prova de Voges-Proskauer (VP).

Material

- Cultura E em ágar inclinado
- Cultura C em ágar inclinado
- Tubos de caldo simples com 1,0% de glicose
- Tubos de caldo simples com 1,0% de lactose
- Agulhas de platina

Nota: O meio-base destas provas de fermentação de açúcar é o caldo simples contendo indicador de Andrade que, em pH ácido, apresenta cor vermelha e, em pH alcalino, é incolor).

Técnica

1. Transfira, com a agulha de platina, um pouco do crescimento de cultura E e da cultura C para cada um dos tubos de glicose e lactose.
2. Deixe na estufa até o dia seguinte (24 horas).
3. Faça a leitura e anote os resultados.

	Fermentação da		Gênero
	Glicose	Lactose	
Cultura C			
Cultura E			

Nota - Prova Positiva - (produção de ácido): Cor vermelha

- (produção de ácido e gás): Cor vermelha, com ar retido no tubo de Durhan)
- Prova Negativa – (não produção de ácido): Incolor

E) Prova do Vermelho de Metila (VM)

Princípio

Fermentação da glicose com produção de ácidos orgânicos (fórmico, láctico, acético e outros) em quantidade tal que o meio de cultura, mesmo tamponado, acidifica-se o suficiente para manter a cor de vermelho de metila (pH < 4,5 = vermelho; pH > 4,5 = amarelo).

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura F em ágar inclinado
- Meio para prova de VM (fosfato de potássio di-básico, 5g; peptona, 5g; glicose, 5g; água destilada, 1000 ml).
- Reativo para a prova de VM (vermelho de metila, 1g; álcool etílico, 300ml; água destilada, 200ml).

- agulha de platina

Técnica

1. Transferir um pouco do crescimento (use agulha de platina) das culturas C e F para o meio de VM
2. Deixe os tubos na estufa a 37° C até o dia seguinte.
3. Adicione 3 a 5 gotas da solução de vermelho de metila ao tubo e observe ocorrência de variação de cor do meio de cultura.
 resultado: positivo - cor vermelha
 negativo - cor inalterada
4. Anote os resultados.

	VM	gênero
Cultura C		
Cultura F		

F) Prova de Voges-Proskauer (VP)

Princípio

Fermentação da glicose com produção de acetoína. Em meio alcalino e na presença de ar, a acetoína é transformada em diacetil que, por sua vez, reage com a creatinina formando um composto de cor vermelha. Como a acetoína é produto intermediário na formação do butilenoglicol, a sua presença no meio indica fermentação butileno-glicólica.

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura F em ágar inclinado
- Meio para prova de VP (o mesmo usado na prova de VM)
- Reativo para a prova de VP (hidróxido de potássio, 40g; creatina, 0,3g; água destilada, 100 ml).
- Agulha de platina.

Técnica

1. Transfira, com a agulha de platina, um pouco de crescimento das culturas C e F para o meio de VP
2. Deixe os tubos na estufa a 37° C até o dia seguinte.
3. Adicione o reativo de VP ao meio de cultura (na proporção 1:1 em relação ao meio) e retorne os tubos para a estufa.
4. Faça a leitura depois de 15 minutos a 1 hora, observando variação de cor na superfície do meio.

Resultado: positivo = cor rósea na superfície do meio
 negativo = cor da superfície do meio inalterada.

5. Anote os resultados.

	VP	gênero
Cultura C		
Cultura F		

G) Prova do Indol

Princípio

Degradação do triptofano com formação do indol. A presença deste é demonstrada pela adição ao meio de cultura de um reativo contendo *p*-dimetil-aminobenzaldeído (reativo de Kovacs).

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura F em ágar inclinado
- Meio de cultura → água peptonada (peptona rica em triptofano, 1g; cloreto de sódio, 5g; água destilada, 1000ml)
- Reativo de Kovacs (*p*-dimetil-aminobenzaldeído, 10g; álcool amílico, 150ml; ácido clorídrico concentrado, 50ml).
- Agulha de platina.

Técnica

1. Transfira, com a agulha de platina, um pouco do crescimento das duas culturas (C e F) para cada um dos tubos de água peptonada.
2. Deixe os tubos na estufa até o dia seguinte.
3. Adicione, a cada tubo, 5 a 10 gotas do reativo de Kovacs e observe a superfície do meio, ponto de contato do reativo com a cultura.
Resultado positivo - a cor do reativo muda de amarelo para vermelho na superfície do meio.
negativo - a cor do reativo fica inalterada (amarela)
4. Anote os resultados.

	Indol	gênero
Cultura C		
Cultura F		

H) Prova do Citrato de Simmons

Princípio

Utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono e de nitrogênio inorgânico como fonte de nitrogênio para a síntese das substâncias necessárias ao crescimento bacteriano. Com a utilização do citrato e do nitrogênio, ocorre alcalinização do meio de cultura, o que é indicado pela variação de cor, de verde para azul.

Material

- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura F em ágar inclinado
- Meio de Citrato de Simmons
- Agulha de platina.

Técnica

1. Transfira, com a agulha de platina, um pouco do crescimento das culturas C e F para cada um dos dois tubos do meio de Citrato de Simmons.
2. Deixe os tubos na estufa até o dia seguinte.
3. Anote os resultados:
positivo = há crescimento bacteriano e a cor do meio torna-se azul.
negativo = não há crescimento e a cor do meio não se altera.

	Citrato de Simmons	gênero
Cultura C		
Cultura F		

I) Pesquisa do Movimento Bacteriano (prova de motilidade)

Princípio

As bactérias flageladas crescem além do ponto de inóculo (“picada”), quando semeadas em ágar semi-sólido com uma agulha de platina. As bactérias que não possuem flagelos crescem apenas no ponto de inóculo.

Material

- Tubo com ágar semi-sólido
- Cultura C
- Cultura F
- Agulha de platina

Técnica

1. Inocular, por “picada”, as culturas C e F (uma em cada tubo de ágar semi-sólido).
2. Incubar a 37°C até o dia seguinte.
3. Observar o crescimento.
Resultado positivo - crescimento bacteriano além do ponto de inóculo
negativo - crescimento bacteriano apenas no ponto de inóculo
4. Anote os resultados.

	Motilidade	gênero
Cultura C		
Cultura F		

J) Prova da Urease

Princípio

Esta prova tem por objetivo verificar se a bactéria produz urease e tem como princípio a hidrólise da uréia presente no meio, com formação de carbonato de amônia que alcaliniza o meio de cultura, determinando mudança de coloração para vermelho. Quando há crescimento bacteriano e a bactéria fermenta a glicose mas não degrada a uréia, ou seja, não produz urease, o meio fica com cor amarela.

Material

- Meio de cultura contendo uréia , Cultura C, Cultura F e Agulha de platina

Técnica

1. Inocular, com a agulha de platina, o meio de uréia com as culturas C e F.
2. Colocar na estufa até o dia seguinte.
3. Ler e anotar os resultados:

Resultado positivo - cor do meio de cultura → vermelha

negativo - cor do meio de cultura → amarela ou inalterada

	urease	gênero
Cultura C		
Cultura F		

K) Prova da Fenilalanina-desaminase

Princípio

Desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina-desaminase, com formação de ácido fenil-pirúvico, cuja presença é revelada pela adição de cloreto férrico à cultura.

Material

- Meio contendo fenilalanina
- Cultura C em ágar inclinado
- Cultura G em ágar inclinado
- Solução a 10% de cloreto férrico
- Agulha de platina

Técnica

1. Inocular, com a agulha de platina, o meio de fenilalanina com as culturas C e G.
2. Colocar na estufa até o dia seguinte.
3. Adicionar 4 a 5 gotas de cloreto férrico sobre a cultura.
4. Ler e anotar os resultados

Resultado positivo - cor da superfície do meio → verde.

negativo - cor da superfície do meio → inalterada

	Fenilalanina- desaminase	gênero
Cultura C		
Cultura G		

PRÁTICA 5 - CONTROLE DE POPULAÇÕES BACTERIANAS

I - Ação dos agentes físicos sobre as bactérias

O calor e várias formas de radiação, bem como outros processos físicos, são frequentemente utilizados com a finalidade de destruir bactérias e outros microrganismos. Verificaremos a ação do calor úmido sobre duas bactérias, uma esporulada e outra não esporulada.

EXERCÍCIOS

A) Ação da temperatura, em função do tempo, sobre cultura bacteriana não esporulada

Material

- Cultura A em ágar inclinado (bactéria não esporulada)
- Tubo contendo 1 ml da solução salina esterilizada
- Placa de Petri contendo ágar nutriente
- Banho-Maria a 60° C
- Alça de Platina

Técnica

1. Divida a placa de ágar nutriente em 4 quadrantes, anotando diferentes períodos de tempo em cada um: 0', 10', 20' e 30'.
2. Coletar com a alça de platina, um pouco do crescimento da cultura A e passar para o tubo contendo solução salina. Homogeneizar a suspensão.
3. Inocule (com alça de platina) a suspensão no quadrante correspondente ao tempo 0'.
4. Coloque o tubo com a suspensão em banho-maria a 60° C e, aos 10', 20' e 30', retire amostras, inoculando-as nos respectivos quadrantes da placa de Petri (proceda exatamente como no item 2).
5. Deixe a placa na estufa até o dia seguinte.
6. Observe a variação quantitativa de crescimento nos quadrantes em função do tempo de aquecimento da cultura e anote os resultados (de + a +++++, conforme a intensidade de crescimento)

Tempo de aquecimento			
0'	10'	20'	30'

B) Ação da temperatura, em função do tempo, sobre cultura bacteriana esporulada

Material

- Cultura E em ágar inclinado (bactéria esporulada)
- Tubo contendo 1 ml de solução salina esterilizada
- Placa de Petri contendo ágar nutriente
- Banho-maria a 60° C
- Alça de platina

Técnica

- Proceda como no exercício A e anote os resultados.

Tempo de aquecimento			
0'	10'	20'	30'

II - Ação dos agentes químicos sobre as bactérias

A ação dos agentes químicos sobre as bactérias é muito importante, do ponto de vista prático e todos devem se familiarizar com estas substâncias, suas ações e limitações. Verificaremos a ação do fenol e do mertiolato sobre algumas bactérias.

EXERCÍCIOS

C) Ação do fenol a 0,8% de acordo com o tempo.

Material

- Tubo contendo solução aquosa a 0,8% de fenol (10 ml)
- Cultura A em caldo
- Placa de Petri contendo ágar nutriente
- Alça de platina
- Pipeta de 1 ml esterilizada

Técnica

1. Adicione, com a pipeta, 1 ml da cultura A aos 10 ml da solução de fenol e misture bem.
2. Imediatamente e após 10', 20' e 30', retire com a alça de platina, amostra da mistura (fenol mais cultura A) e inócupe nos respectivos quadrantes da placa de Petri (0', 10', 20' e 30').
3. Deixe a placa na estufa, a 37°C, até o dia seguinte.
4. Leia os resultados, anotando a variação quantitativa de crescimento (+ a +++) em cada um dos quadrantes da placa, em função do tempo de tratamento da cultura com o fenol.

Tempo de tratamento com o fenol			
0'	10'	20'	30'

D) Ação de anti-séptico sobre as bactérias da pele

Material

- Placa de Petri contendo ágar nutriente
- Zaragatoas estéreis
- Mertiolato
- Solução salina estéril

Técnica

1. Divida a placa de ágar nutriente em duas partes.
2. Umedeça uma zaragatoa em solução salina e esfregue-a vigorosamente no dorso de uma das mãos, numa extensão de aproximadamente 4 cm². Inocule, a seguir, numa das metades da placa de ágar nutriente.
3. Umedeça uma outra zaragatoa com mertiolato e esfregue-a no dorso da outra mão, em área semelhante.
4. Espere 5 minutos para que haja ação do antisséptico e secagem da superfície. Passe então, nessa área, uma terceira zaragatoa umedecida com salina, tomando cuidado para não atingir a área não tratada. Inocule a outra metade da placa de ágar.
5. Deixe a placa na estufa, a 37° C, até o dia seguinte.
6. Leia os resultados, anotando a variação quantitativa de crescimento (+ a ++++), em função da presença do mertiolato.

Tratamento	
Sem anti-séptico	Com anti-séptico

PRÁTICA 6 - TRANSFERÊNCIA DE RESISTÊNCIA A DROGAS ENTRE BACTÉRIAS

Os genes que conferem resistência bacteriana a drogas frequentemente localizam-se em partículas de DNA extracromossômico chamadas *plasmídios*, bastante comuns em microrganismos patogênicos. Os plasmídios podem ser transferidos de uma célula bacteriana para outra e, desta forma, os genes de resistência a drogas podem ser disseminados numa população bacteriana, através dos mesmos, a partir de uma bactéria resistente portadora. A transferência de plasmídios ocorre por *conjugação* ou por *transformação*. No primeiro caso, há necessidade de contato físico entre a bactéria portadora do plasmídio (doadora) e a bactéria receptora. A transformação ocorre quando uma bactéria sensível a um dada droga torna-se resistente, ao incorporar DNA plasmidial presente no meio e que contem o gene para resistência ao antimicrobiano.

A conjugação é um fenômeno relativamente comum de transferência de plasmídios na natureza. Já a transformação é um mecanismo mais raro e normalmente é artificialmente induzida em laboratório em experimentos de transferência de DNA cromossômico ou plasmidial. O exercício prático desta aula consistirá na transferência de resistência ao antibiótico canamicina, de uma *Salmonella*, para uma *Escherichia coli*, através de conjugação.

EXERCÍCIO

Material

- Meio de MacConkey
- Meio de MacConkey contendo Canamicina na concentração de 20 mg/ml
- Cultura em caldo da bactéria A (*Salmonella* sp, lactose -)
- Cultura em caldo da bactéria B (*Escherichia coli*, lactose +)
- Tubo de ensaio contendo mistura de cultura A mais cultura B (0,1 ml da cultura A + 0,1 ml da cultura B foram transferidos para 5 ml de caldo nutriente e esta mistura foi previamente incubada a 37° C, durante 18 horas)
- Pipetas estéreis
- Solução salina estéril (2 tubos com 9 ml) para diluir a mistura A + B
- Alça de platina

Técnica

1. Dividir as placas de Mac Conkey (com e sem canamicina) em duas partes.
2. Semear, por esgotamento com a alça de platina, a cultura A numa das metades da placa de MacConkey contendo canamicina e a cultura B na outra metade. Incubar a 37° C até o dia seguinte.
3. Repetir o procedimento do item 2 na placa de Mac Conkey sem canamicina
4. Tomar uma alçada da mistura A + B e semear, por esgotamento, na placa de MacConkey contendo antibiótico. Repetir este procedimento com uma diluição a 1/100 da mistura A+B. Incubar por 24 horas.
5. Observar ocorrência de crescimento da cultura A e B separadas e da mistura A+B diluída e não diluída.

Anotar os resultados

	Crescimento em Mac Conkey		Lactose
	Com Canamicina	Sem Canamicina	
Cultura A			
Cultura B			
Mistura A+B			
Mistura A+B diluída			

Bactéria sensível - ausência de crescimento.

Bactéria resistente - presença de crescimento.

PRÁTICA 7 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE BACTERIANA A DROGAS

Após o isolamento de uma bactéria de um processo infeccioso, é desejável em alguns casos, conhecer a sua sensibilidade ou resistência a vários antibióticos e quimioterápicos. Isto se consegue com o emprego de vários métodos, sendo que o método do disco de papel de filtro impregnado com solução da droga (Método de Bauer e Kirby) é o mais amplamente utilizado.

EXERCÍCIO

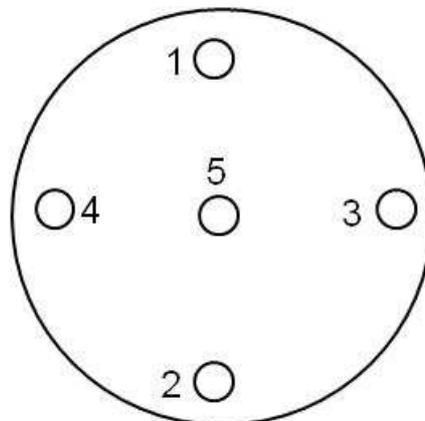
Antibiograma pelo Método de Bauer e Kirby

Material

- Cultura B em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*): cinco colônias da cultura B foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 37° C durante 4 horas.
- Placa de Petri contendo meio de Mueller-Hinton
- Discos de papel de filtro impregnado com soluções de drogas antimicrobianas
- Zaragatoa
- Agulha estéril
- Escala 0,5 de MacFarland
- Solução salina estéril
- Pipeta estéril
- Régua

Técnica

1. Transferir, com a pipeta, o crescimento da cultura B para o tubo contendo solução salina, ajustando a concentração de bactérias, conforme a escala 0,5 de MacFarland. O ajuste de concentração é feito por comparação da turbidez da cultura com a do tubo da escala.
2. Umedecer a zaragatoa neste crescimento de concentração padronizada; esgotar o excesso de cultura na parede do tubo e inocular uniformemente em toda a superfície da placa de Petri contendo o meio de Müller-Hinton.
3. Esperar secar.
4. Colocar, sobre a superfície do ágar, com o auxílio de uma agulha estéril, os discos de papel de filtro impregnados com as drogas. A disposição dos discos deve obedecer o esquema da figura abaixo
5. Colocar a placa de Petri na estufa a 37° C, até o dia seguinte.
6. Com o auxílio de uma régua, medir o diâmetro do halo de inibição do crescimento.
7. Consultar a tabela de referência, fornecida pelo instrutor, para interpretar os resultados e anotar no quadro da página seguinte.



Droga	Concentração (ug/ml)	Diâmetro do halo de inibição do crescimento	Interpretação*
1			
2			
3			
4			
5			

* S = Sensível; R = Resistente; I = Intermediário

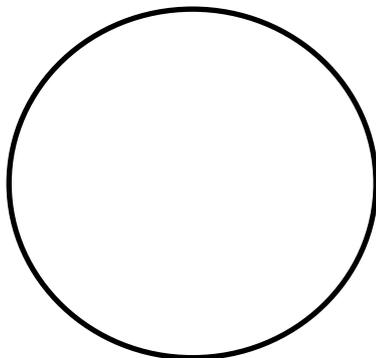
PRÁTICA 8 - Gênero *Staphylococcus*

EXERCÍCIOS

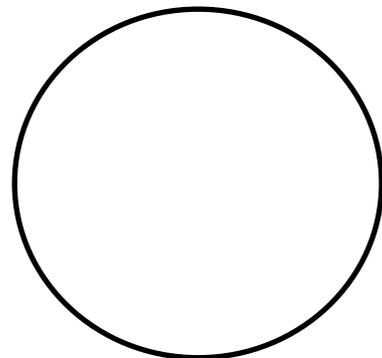
A) Observar placas de ágar sangue semeadas com as culturas A e B. Descrever as características das colônias e verificar hemólise.

Cultura	Características das Colônias	Hemólise
A		
B		

B) Corar, pelo método de Gram, esfregaços das culturas A e B (ver “Morfologia e coloração da bactérias”, página 1). Observar ao microscópio e desenhar.



Cultura A



Cultura B

C) Prova da Catalase

Colocar sobre as culturas A e B algumas gotas de água oxigenada. Observar a reação e anotar os resultados. (Obs., ver técnica na página 10)

Cultura	Prova da Catalase
A	
B	

D) Prova da Coagulase

Princípio

A coagulase é uma enzima, produzida por certas bactérias, que coagula o plasma sanguíneo.

Técnica

Misturar 0,5 ml da cultura A com 0,25 ml de plasma citratado de sangue de coelho a 1%. Incubar a 37°C e observar durante 4 horas. Fazer o mesmo com a cultura B e anotar os resultados.

Resultado positivo - formação de coágulo.
negativo - suspensão inalterada

Cultura	Prova da Coagulase
A	
B	

E) Prova da DNase

Princípio

A DNase é uma enzima, produzida por certas bactérias, que hidroliza o DNA. Para pesquisá-la, basta colocar ácido clorídrico (HCl) sobre as colônias a serem testadas. O HCl precipita o DNA contido na cultura, turvando o meio. Se a bactéria produzir DNase, haverá hidrólise de DNA e conseqüentemente não turvação do meio de cultura, pois o HCl não precipita DNA hidrolizado.

Técnica

Verter ácido clorídrico 1N sobre a placa semeada com a cultura A e sobre a placa com a cultura B. Verificar o aparecimento de halo claro ao redor das colônias.

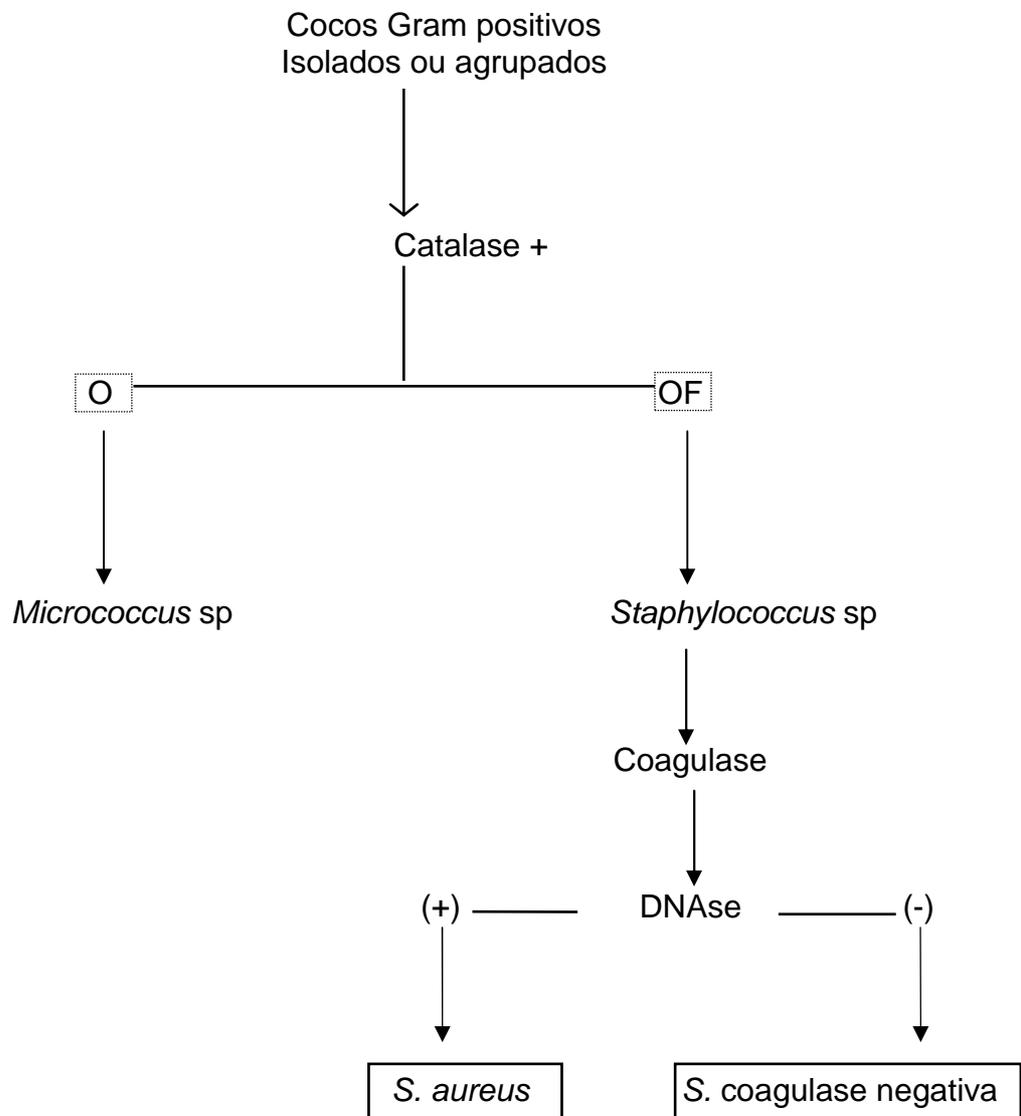
Resultado:positivo: aparecimento de halo claro ao redor das colônias.
negativo: turvação do meio.

Cultura	Prova da DNase
A	
B	

F) Identificação das culturas

Cultura A	
Cultura B	

ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS
Staphylococcus e *Micrococcus* (família *Micrococaceae*)



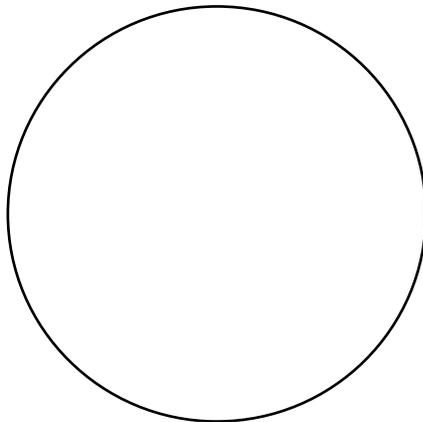
PRÁTICA 9 – Gênero *Streptococcus*

EXERCÍCIOS

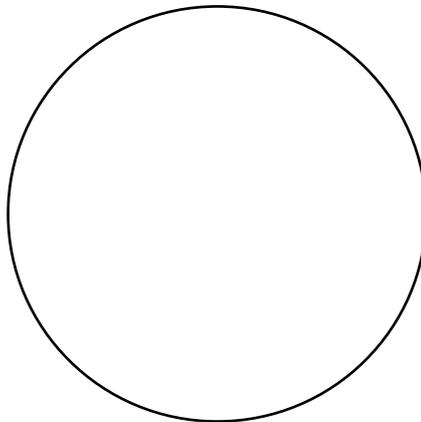
A) Observar placas de ágar sangue semeadas com as culturas C, D e E. Descrever as características das colônias e verificar hemólise.

Cultura	Características das Colônias	Hemólise
C		
D		
E		

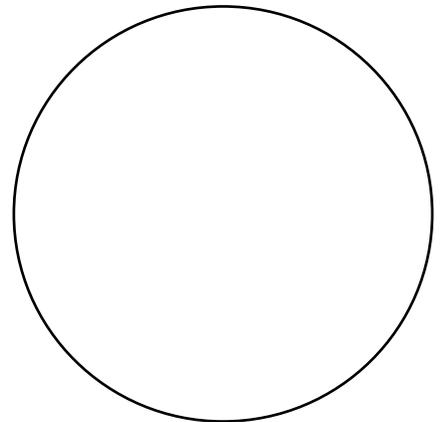
B) Corar, pelo método de Gram, esfregaços das culturas C, D e E, observar ao microscópio e desenhar.



Cultura C



Cultura D



Cultura E

C) Prova da catalase.

Colocar sobre a cultura C (em caldo) algumas gotas de água oxigenada. Verificar a reação e anotar o resultado. Fazer o mesmo com as culturas D e E.

Cultura	Catalase
C	
D	
E	

D) Prova da bile solubilidade

Princípio: Esta prova verifica a sensibilidade da bactéria à lise por sais biliares

Técnica: Adicionar 0,1 ml de uma solução a 10% de desoxicolato de sódio a 1 ml da cultura D. Incubar a 37° C e examinar após 15 minutos. Anotar o resultado. Fazer o mesmo com a cultura E.

Leitura. Resultado positivo (suspensão solúvel)-a cultura fica transparente.

negativo (suspensão insolúvel)- a cultura permanece turva.

Cultura	Bile-solubilidade
D	
E	

E) Prova da sensibilidade a optoquina

Princípio: Esta prova verifica a sensibilidade das bactérias A e E à optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídrica)

Técnica: Adicionar um disco contendo a substância em uma placa de Agar sangue semeado com as bactérias a serem testadas. Incubar a 37° C e examinar após 24 horas. Anotar o resultado. Fazer o mesmo com a cultura E.

Leitura. Resultado positivo (suspensão solúvel)-a cultura fica transparente.
negativo (suspensão insolúvel)- a cultura permanece turva.

Cultura	Optoquina
D	
E	

F) Identificação das culturas

Cultura C	
Cultura D	
Cultura E	

G) Prova de sensibilidade à bacitracina.

Princípio: O princípio desta prova baseia-se na inibição de crescimento do *Streptococcus pyogenes* (β -hemolítico, grupo A) frente a uma pequena quantidade de bacitracina.

Técnica: Verificar se ocorre uma zona de inibição de crescimento ao redor do disco de papel de filtro contendo bacitracina, colocado sobre a cultura C.

Leitura: sensível: existência de uma zona de inibição do crescimento.
resistente: ausência de zona de inibição de crescimento.

H) CAMP Teste

Princípio: A atividade da hemolisina β do *S. aureus* é aumentada pela atividade

hemolítica do *S. agalactiae* (β -hemolítico do grupo B).

Técnica: Verificar zona de hemólise, em placa de ágar sangue (feito c/ sangue de carneiro), semeada com *S. agalactiae* e *S. aureus*.

Leitura: resultado - positivo: formação de uma zona de hemólise semelhante à "ponta de flecha" na união das duas hemolisinas.

negativo: não formação de "ponta de flecha".

PRÁTICA 10 – ENTEROBACTÉRIAS

As enterobactérias são bacilos Gram negativos morfologicamente indistinguíveis entre si e pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Compreendem vários gêneros e espécies, algumas das quais divididas em tipos sorológicos ou sorotipos.

As enterobactérias são citocromo-oxidase negativas, fermentam a glicose, reduzem nitrato a nitrito, crescem bem nos meios de cultura comuns e, quando móveis, possuem flagelos peritríquios. A identificação de gêneros dentro da família é feita através de uma série de provas bioquímicas e através do teste de motilidade (ver páginas 10 a 18). Algumas provas são especialmente úteis para a diferenciação de alguns gêneros, como por exemplo, a prova de urease e da fenilalanina para os gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia*.

Assim como para a maioria dos microrganismos patogênicos, a identificação a nível de espécie de uma enterobactéria nem sempre satisfaz ao clínico e ao epidemiologista. Por exemplo, quando isolamos um colibacilo das fezes de um recém-nascido com diarreia, não é suficiente dizer que se trata de uma *Escherichia coli* mas, devemos proceder a identificação a nível intraespecífico porque nem todos os colibacilos são diarreagênicos. Do mesmo modo, a identificação de um sorotipo de *Salmonella* pode ser indispensável ao trabalho de um epidemiologista que estuda infecções entéricas. Deste modo, a identificação da espécie deve ser complementada com métodos sorológicos para caracterização da cepa, a fim de se ter uma idéia de seu potencial de patogenicidade.

A identificação sorológica pode ser aplicada a qualquer espécie de enterobactéria mas, na prática, é feita para *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*. A sorologia baseia-se na detecção de variações antigênicas de alguns constituintes bacterianos como o antígeno capsular K, o antígeno O do LPS e a flagelina, proteína que constitui o flagelo (H). Variações dos antígenos O definem sorogrupos. Bactérias de um mesmo sorogrupo frequentemente apresentam variações antigênicas no antígeno flagelar H e capsular K. Em *E. coli*, a combinação de variantes O:K:H, ou apenas O:H, define um sorotipo. Embora isto não seja sempre possível na prática, a identificação precisa de uma *Escherichia coli* enteropatogênica requer a caracterização a nível de sorotipo.

A tipagem dos antígenos O, K e H é feita através de reações de aglutinação utilizando-se soros preparados por inoculação de amostras padrões em coelhos. Estes soros podem ser dirigidos contra antígenos individuais (soros monovalentes) ou contra uma mistura de antígenos (soros polivalentes). A sorotipagem de uma amostra bacteriana é feita inicialmente com soros polivalentes. Quando a reação é positiva, submete-se a amostra a reações individuais com cada um dos soros monovalentes do *pool* contido no soro polivalente.

Meios de Cultura utilizados para o enriquecimento e isolamento de enterobactérias.

Meio de enriquecimento: Meio de tetracionato. Favorece o crescimento das enterobactérias do gênero *Salmonella* e inibe o crescimento de outras enterobactérias.

Meios de isolamento. Esses meios foram idealizados para o isolamento de enterobactérias patogênicas das fezes. Possuem componentes que eliminam bactérias da microbiota normal e facilitam a diferenciação entre bactérias patogênicas e não patogênicas. São, portanto, meios seletivos e diferenciais (ver página 7). Os meios mais utilizados são MacConkey, *Salmonella-Shigella* (SS), verde brilhante e hektoen.

MacConkey. Impediente para bactérias Gram positivas, permitindo o crescimento das enterobactérias. Bactérias fermentadoras da lactose apresentam colônias vermelhas e não fermentadoras, colônias incolores.

Ágar SS. Impediente para bactérias Gram positivas e enterobactérias da microbiota intestinal normal, possibilitando o isolamento de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Yersinia enterocolitica*. A coloração das colônias Lac + e Lac - no ágar SS é semelhante à observada no MacConkey.

Ágar hektoen. Impediente para bactérias Gram positivas, enterobactérias da microbiota intestinal normal, possibilitando o crescimento de *Shigella* e *Salmonella* (exceto *Salmonella typhi*, que cresce com menor intensidade). As bactérias fermentadoras de lactose formam colônias de cor amarela ou alaranjada enquanto que as não fermentadoras apresentam colônias incolores.

Meios de cultura utilizados para identificação de enterobactérias.

Meio TSI

O meio TSI (*triplice sugar iron* ou triplice açúcar ferro) contém glicose (0.1%), lactose (1.0%), sacarose (1.0%), uma base sulfurada, um sal férrico e, como indicador de pH, o vermelho fenol, que lhe confere cor vermelha. O TSI é um meio sólido que deve ser mantido em posição inclinada, quando do seu preparo. A inoculação é feita a partir de uma colônia bem isolada, por picada em toda a base e esgotamento na superfície.

Culturas em TSI de bactérias que fermentam somente a glicose produzem mudança de coloração para amarelo na base, mantendo a cor original do meio na superfície. Embora outras explicações possam ser dadas, parece mais provável que isto decorra da diferença no volume de crescimento nas duas partes do meio (base e superfície). Na superfície, onde o crescimento bacteriano é abundante, a acidez resultante da fermentação da glicose é neutralizada pelos produtos do metabolismo proteico, o mesmo não ocorrendo na base, onde o crescimento se restringe ao ponto de inoculação (picada), não havendo, portanto, quantidade suficiente de metabólitos para neutralizar os ácidos produzidos. Se a bactéria fermenta a lactose e/ou sacarose, açúcares que se encontram em concentrações 10 vezes superior a da glicose, a quantidade de ácido formada será bem maior e, desta

forma, não haverá neutralização por outros produtos do metabolismo bacteriano. Conseqüentemente, tanto a base como a superfície acidifica-se, apresentando coloração amarela. Assim sendo, conforme as reações que ocorrem na base, na superfície e em toda a extensão do meio, pode-se saber se apenas a glicose ou se também a sacarose e/ou a lactose foram metabolizadas. Além disto, o meio TSI permite verificar se houve produção de H₂S e gás. O resultado positivo para H₂S é indicado pelo surgimento de cor escura no meio e, de gás, pela retenção de bolhas de ar.

Meio EPM

O meio EPM também é um meio sólido, que deve ser mantido em posição inclinada após o preparo, como o TSI. Este meio resultou da modificação de um meio tradicional, de uso muito comum em Bacteriologia, o meio de Rugai. A modificação foi feita na Escola Paulista de Medicina, cujas iniciais designam o meio, e teve como objetivo ampliar o número de provas do meio de Rugai. No EPM, são realizadas 5 provas: urease, fenilalanina-desaminase, H₂S, glicose e produção de gás. O meio estéril apresenta coloração verde clara. Quando semeado com uma cultura-teste, apresenta-se multicolorido. A coloração azul na base indica resultado positivo para urease e, verde escuro na superfície, positivo para fenilalanina-desaminase. Assim como no meio de TSI, o resultado positivo para glicose e H₂S é indicado, respectivamente, por coloração amarela e por pontos escuros na base. Bactérias produtoras de gás retêm o mesmo no interior do meio (formação de bolhas), do mesmo modo que no meio TSI.

Embora o meio EPM facilite o trabalho, ao permitir a realização de 5 provas de uma só vez, a leitura dos resultados nem sempre é fácil. Frequentemente o resultado positivo de uma prova impede a leitura de outra. É o caso, por exemplo, da urease. Bactérias que apresentam reação muito forte nesta prova (quando o meio fica todo azulado) têm o resultado da glicose mascarado. Neste caso, a prova de glicose deve ser repetida em um meio de cultura específico para glicose.

Meio de MILi

A designação deste meio é formada pelas iniciais das três provas que nele são testadas: Motilidade, Indol e Lisina-descarboxilase (LDC). Sua formulação também deve-se ao trabalho de pesquisadores da Escola Paulista de Medicina. O meio MILi é um meio semi-sólido e, quando estéril apresenta coloração vinho. Após o crescimento de uma cultura, pode ficar turvo em toda sua extensão ou somente na linha do inóculo (picada). No primeiro caso, trata-se de uma bactéria móvel e, no segundo, de uma bactéria imóvel. Bactérias LDC+ mantêm a coloração original do meio e LDC- mudam a coloração de vinho para amarelo. A revelação da prova de indol segue o mesmo procedimento da prova realizada com cultura crescida em meio específico (ver página 15): após o crescimento da cultura, coloca-se entre 5 a 10 gotas de reativo de Kovacs, espera-se alguns segundos, e observa-se a superfície do meio. Bactérias indol positivas mudam a cor do reativo de Kovacs para vermelho.

EXERCÍCIOS

A) Observar a coloração das colônias das bactérias A, B e C cultivadas em placas de MacConkey, ágar SS e hektoen. Anotar os resultados da prova de lactose.

Cultura	coloração da colônia em			lactose
	MacConkey	SS	Hektoen	
A				
B				
C				

B) Observar e interpretar crescimento das culturas A, B e C em meio de TSI.

	Cultura em TSI		
	A	B	C
coloração da base			
coloração da superfície			
H ₂ S			
gás			

C) Identificação bioquímica

A partir do TSI, inocular as culturas A, B e C em séries bioquímicas (meios de EPM, MILi e citrato de Simmons) e incubar a 37°C. Anotar os resultados e identificar as culturas, com base no perfil bioquímico, utilizando a tabela da página 41.

Provas	A	B	C
citrato			
glicose			
gás			
urease			
H ₂ S			
Fenilalanina			
motilidade			
lisina			
Indol			
lactose*			

Espécie/ gênero			
--------------------	--	--	--

*resultado da prova de lactose: ver item A

D) Reação sorológica para confirmação dos resultados de identificação bioquímica.

Fazer reação de aglutinação em lâmina com as culturas A, B e C, utilizando os soros anti - *S. flexneri*, anti - *E. coli* O55 e anti - *Salmonella* sp. Anotar os resultados (positivo ou negativo).

Soro	Cultura		
	A	B	C
Anti - <i>Escherichia coli</i> O55			
Anti - <i>Shigella flexneri</i>			
Anti - <i>Salmonella</i>			

Comportamento de Enterobactérias fermentadoras (lac +) e não fermentadoras (lac -) de lactose em MacConkey, ágar SS e ágar hektoen. Diferenciação baseada na coloração das colônias

Bactérias	Gênero	Cor da colônia em	
		MacConkey e SS	ágar hektoen
Fermentadoras	<i>Escherichia</i>	vermelha	alaranjada
	<i>Klebsiella</i>	vermelha	alaranjada
	<i>Enterobacter</i>	vermelha	alaranjada
	<i>Serratia</i>	vermelha	alaranjada
Não fermentadoras	<i>Shigella</i>	incolor	incolor
	<i>Salmonella</i>	incolor	incolor
	<i>Proteus</i>	incolor	incolor
	<i>Morganella</i>	incolor	incolor
	<i>Yersinia</i>	incolor	incolor

Perfil Bioquímico e Motilidade de Algumas Espécies de Enterobactérias

Prova	<i>E. coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettigeri</i>
Citrato	-	-	-	+ ou -	+	+	+	+	+ ou - -	+ ou -	-	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gás	+	-	+	+	+	+	+	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -	+ ou -
Urease	-	-	-	-	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -	+ ou	+	+	+
H ₂ S	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Motilidade	+ ou -	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+ ou -	+
Lisina	+ ou -	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Indol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	+ ou -	+	+ ou -	-	-	-	-	-