

# Prática 3: Semeadura, isolamento e identificação de microrganismos (diferenciação)

## • Introdução:

As necessidades nutritivas das bactérias são variáveis. Entre as cultiváveis, em um extremo estão as que só se proliferam em substâncias orgânicas, e no outro, as que se proliferam em substratos inteiramente inorgânicos. Todas as bactérias de importância médica pertencem ao primeiro grupo.

Para que as bactérias possam crescer e se multiplicar nos meios de cultura é necessário que disponham de uma fonte de C e de N; só assim podem efetuar a síntese de sua própria matéria orgânica. Além das duas fontes mencionadas incorpora-se ao meio de cultura, os chamados fatores de crescimento, representados por certos aminoácidos (triptofano, cistina, etc) e certas vitaminas (complexo B). Estas e outras substâncias que compõem o meio de cultura são o alimento bacteriano, os chamados nutrientes ou substâncias extracelulares que penetram na célula através de sua membrana e são usadas pelos microrganismos para a obtenção de energia e construção de seu “esqueleto”.

Chama-se meio de cultura a um substrato ou uma solução nutriente nos quais os microrganismos são cultiváveis em laboratório. E dá-se o nome de cultura a qualquer crescimento ou cultivo de microrganismo.

Para cultivo das bactérias de importância médica, usamos meio de cultura complexo, contendo substâncias orgânicas facilmente utilizáveis e, evidentemente, água e íons. Dependendo das exigências dos microrganismos, podem ser adicionados, ou não, sangue e compostos ricos em vitaminas. O ágar, usado nos meios de cultura, não tem valor nutricional. Para o cultivo de qualquer microrganismo deve-se levar em conta a *temperatura*, o *pH* e as *necessidades respiratórias*.

Os meios de cultura usados podem ser de três tipos: sólidos (ágar comum, ágar sangue, ágar MacConkey, ágar SS); líquidos (caldo de nutriente, caldo glicosado, caldo TSB, etc) e semi sólidos (Meio de Tioglicolato). Os meios utilizados para pesquisar microrganismos também podem ser seletivos e/ou diferenciais.

**Meios seletivos** - permitem o crescimento de apenas um ou alguns grupos de bactérias (Exemplos: Ágar MacConkey, TCBS, Ágar Baird Parker etc).

**Meios diferenciais** - permitem, através da visualização macroscópica, a diferenciação de grupos de microrganismos com características fisiológicas diferentes.

**Meios sintéticos ou quimicamente definidos** - sua composição química é conhecida quantitativamente.

**Meios complexos** - sua composição química é conhecida qualitativamente.

## • Material da prática (nas bancadas)

a. Culturas de bactérias (em eppendorfs):

(A) - *Escherichia coli* (G-)

(B) – *Salmonella* spp. (G-)

(C) – *Staphylococcus aureus* (G+)

b. Alça microbiológica

c. Quatro placas de Petri contendo os seguintes meios:

Ágar MacConkey, AMS (Ágar Manitol Salgado), AN (Ágar Nutriente), AVB (Ágar Verde Brilhante).

d. Um tubo de ensaio contendo o meio Ágar Citrato de Simmons

<b>CONSTITUIÇÃO DOS MEIOS</b>					
<b>AVB - Ágar Verde Brilhante (g/L)</b>		<b>AMS - Ágar Manitol Salgado (g/L)</b>		<b>MC - Ágar MacConkey (g/L)</b>	
Digestão enzimática de caseína	5	Digestão enzimática de caseína	5	Peptona	20
Digestão enzimática de tecido animal	5	Digestão enzimática de tecido animal	5	Lactose	10
Lactose	10	Extrato de carne bovina	1	Sais biliares	1.5
Sacarose	10	D-manitol	10	Cloreto de sódio	5
Cloreto de sódio	5	Cloreto de Sódio	75	Vermelho Neutro	0.03
Vermelho de fenol	0.08	Vermelho de fenol	0.025	Cristal violeta	0.001
Verde brilhante	0.0125	Ágar	15	Ágar	13.5
Ágar	20	pH 7.4 ± 0.2 a 25°C		pH 7.1 ± 0.2 a 25°C	
pH 6.9 ± 0.2 a 25°C					
<b>AN - Ágar Nutriente - g/L</b>			<b>ACS - Ágar Citrato de Simmons (g/L)</b>		
Extrato de carne	1	Di-hidrogenofosfato de amônio	5		
Extrato de levedura	2	Fosfato dipotássico	1		
Peptona	5	Cloreto de sódio	5		
Cloreto de sódio	5	Citrato de sódio	2		
Ágar	15	Sulfato de magnésio	0.2		
pH 6.5 ± 0.2 a 25°C		Azul de bromotimol	0.08		
		Ágar	15		
		pH 6.9 ± 0.2 a 25°C			

<b>Indicadores de pH</b>		
<b>Corante</b>	<b>Faixa de viragem - pH</b>	<b>Mudança de cor</b>
Azul de bromotimol	6.0 – 7.6	Amarelo - azul
Vermelho de fenol	6.4 – 8.2	Amarelo – vermelho
Vermelho Neutro	6.8 – 8.0	Vermelho – amarelo

#### • Procedimento

1. Semear cada microrganismo (amostras estão nos tubos de eppendorf) em meio comum e em meio seletivo.
2. Incubar as culturas semeadas em estufa a 35°C por 24 horas

- Resultados esperados na Leitura (\*algumas culturas podem dar pequenas diferenças devido às diferenças de lote e origem dos meios de cultivo)



AVB com cultura positiva para *Salmonella spp*



Macconkey com cultura positiva para *Salmonella spp.* (amarela) e *E.coli* (vermelha)



AMS com cultura positiva para *Staphylococcus aureus* (amarela) e *E.coli* (vermelha)



Citrato de Simmons com cultura positiva para *Klebsiella, Salmonella*



Ágar Nutriente, cor creme para todas as bactérias

A partir dos resultados obtidos em aula, preencha a tabela abaixo segundo a coloração obtida nos meios e o crescimento [nenhum (n), negativo (-), positivo (+)]

	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i>
Ágar MacConkey			
Ágar Manitol Salgado			
AVB			
AN			
Citrato de Simmons			