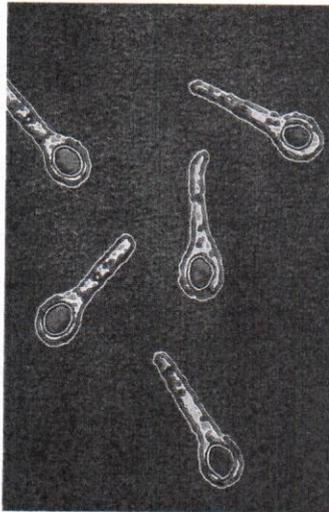




(a)



(b)

➤ **Fig. 6.18 Endosporos bacterianos em duas espécies de *Clostridium*.** (a) Células com endosporos localizados centralmente. (b) TEM colorida de células com endosporos localizados na extremidade, o que confere ao organismo uma forma de clava.

produzidos em grandes quantidades, são dispersados em um meio favorável, formam novos filamentos. Ao contrário dos endosporos, estes esporos contribuem para a reprodução das espécies.

Cultivo de Bactérias

O cultivo de bactérias em laboratório apresenta dois problemas. Primeiro, é preciso uma cultura pura de uma única espécie para

se estudar as características de um organismo. Em segundo lugar, é preciso encontrar um meio que permita o crescimento do organismo desejado. Veremos algumas maneiras de solucionar estes problemas.

Métodos de Obtenção de Culturas Puras

Para o estudo de bactérias em laboratório, é importante se obter uma **cultura pura**, uma cultura que contenha apenas uma única espécie de organismo. Antes do desenvolvimento das técnicas de cultura pura, os cientistas estudavam *culturas mistas*, ou culturas contendo diversos tipos de organismos. Os pesquisadores conseguiam observar diferentes formas e tamanhos de organismos, mas descobriam pouco sobre as necessidades nutricionais ou sobre as características do crescimento de espécies individuais. Hoje, as culturas puras são obtidas através do isolamento dos descendentes (ou prole) de uma única célula.

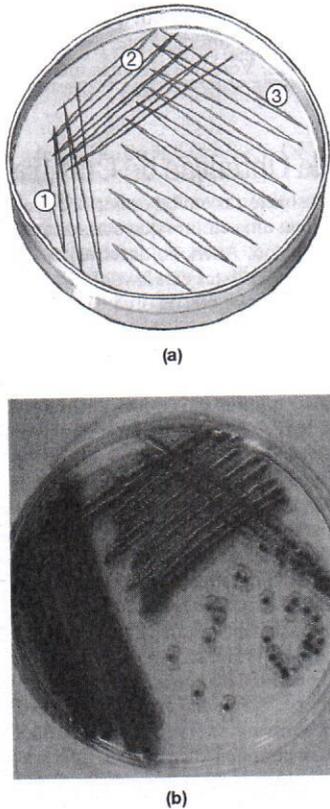
Apesar de agora parecer simples, a técnica de isolar culturas puras foi difícil de ser desenvolvida. Tentativas de isolar células por diluição seriada foram frequentemente malsucedidas, pois dois ou mais organismos de diferentes espécies estavam várias vezes presentes nas mais altas diluições. A técnica de Koch de espalhar poucas bactérias em uma superfície sólida foi mais eficiente, pois ela depositava uma única bactéria em alguns locais. Entretanto, ele tentou várias substâncias sólidas diferentes. Fazendo uso da descoberta de Angelina Hesse, esposa de um colaborador, ele estabeleceu o ágar como o agente solidificante ideal. Poucos organismos o digerem, e, preparado em uma solução de 1,5%, ele não se funde a uma temperatura inferior a 95°C. Além disso, depois de fundido, o ágar permanece líquido até esfriar a 40°C, temperatura fria o suficiente para permitir a adição de nutrientes e de organismos vivos que poderiam ser destruídos pelo calor.

O Método do Esgotamento

Hoje, a maneira correta de preparar culturas puras é utilizar o **método do esgotamento** em placas de ágar. As bactérias são recolhidas com uma alça metálica estéril, e a alça é movida levemente na superfície do ágar, depositando as bactérias nas estrias resultantes. A alça de inoculação é flambada e algumas bactérias são retiradas da região já depositada e estriadas em uma nova região (➤ Fig. 6.19). À medida que o esgotamento continua, cada vez menos bactérias são depositadas, sendo a alça flambada após cada estriamento. Os organismos individuais são depositados na última região estriada. Depois de a placa ser incubada a uma temperatura de crescimento adequada ao organismo, aparecem pequenas colônias, cada uma derivada de uma única célula bacteriana. A alça metálica é usada para se retirar uma porção de uma colônia isolada e transferi-la para qualquer meio estéril apropriado, para estudos posteriores. O uso de técnicas estéreis (assépticas) assegura que o novo meio irá conter organismos de uma única espécie.

O Método *Pour Plate*

Outra maneira de obter culturas puras é o **método *pour plate***, que utiliza diluições em série (➤ Fig. 6.7a). São feitas diluições de modo que a diluição final contenha em média mil organismos. Então, coloca-se 1 ml do meio líquido da diluição final em 9 ml de ágar fundido (45°C) e o meio é rapidamente vertido em uma placa estéril. A placa resultante conterá um pequeno número de bactérias, algumas das quais formarão colônias isoladas no ágar. Este método permite que alguns organismos fiquem embebidos no meio. É par-



> Fig. 6.19 Método de esgotamento para obtenção de culturas puras. (a) Uma gota ou uma pequena quantidade de cultura em uma alça metálica de inoculação é levemente estriada na parte superior da região 1 do ágar. A alça é flambada, a placa é girada e alguns organismos são retirados desta região e estriados na região 2. A alça é novamente flambada e o processo é repetido na região 3. A placa é então incubada. (b) Uma placa de *Serratia marcescens* após semeadura pelo método de esgotamento e incubação. Observe a grande redução do número de colônias a partir da região inicial.

ticularmente útil para o crescimento de microaerófilos que não toleram a exposição ao oxigênio do ar na superfície do meio.

Meios de Cultura

Na natureza, muitas espécies de bactérias e de outros microrganismos são encontradas crescendo juntas em oceanos, lagos, solo e em matéria orgânica viva ou morta. Estes materiais podem ser considerados *meios de cultura naturais*. Apesar de as amostras do solo e da água serem muitas vezes trazidas ao laboratório, os organismos neles contidos são normalmente isolados e culturas puras são preparadas para estudo.

Para cultivar bactérias em laboratório, é preciso conhecer suas necessidades nutricionais e ter a habilidade de fornecer as substâncias necessárias ao meio. Ao longo de anos de experiência em cultivar bactérias em laboratório, os microbiologistas aprenderam quais nutrientes devem ser supridos para cada um dos diferentes organismos. Certos organismos, tais como aqueles que causam a

sífilis e a lepra, ainda não podem ser cultivados em meios de laboratório. Eles devem crescer em culturas que contenham células vivas oriundas de seres humanos ou de outros animais. Muitos outros organismos cujas necessidades nutricionais são razoavelmente conhecidas podem crescer em um ou mais tipos de meios.

Tipos de Meios

Os meios de laboratório são geralmente meios sintéticos, em oposição aos meios naturais anteriormente mencionados. Um **meio sintético** é um meio preparado em laboratório a partir de materiais de composição precisa ou razoavelmente bem definida. Um **meio sintético definido** é aquele que contém tipos e quantidades de substâncias químicas conhecidas e específicas. Exemplos de meios sintéticos definidos são apresentados nos Quadros 6.2 e 6.3. Um **meio complexo**, ou **meio quimicamente não-definido**, é aquele que contém determinados materiais razoavelmente conhecidos, mas que variam ligeiramente na sua composição química de partida para partida. Tais meios contêm sangue ou extratos de carne, soja, levedura e outros organismos. Um ingrediente comum é a **peptona**, um produto da digestão enzimática das proteínas. Ela fornece pequenos peptídios que podem ser utilizados pelos microrganismos. Apesar de as concentrações exatas não serem conhecidas, os meios complexos contêm oligoelementos e vitaminas em quantidades suficientes para permitir o crescimento de muitos organismos. Tanto as culturas em caldo nutritivo quanto aquelas em meios de ágar solidificado, usados para cultivar muitos organismos, são meios complexos. Um exemplo de meio complexo é apresentado no Quadro 6.4.

Meios Comumente Utilizados

A maioria das culturas de rotina dos laboratórios utiliza meios contendo peptona de carne de boi ou de peixe em meios de cultura em caldo nutritivo ou ágar sólido. Tais meios são às vezes enriquecidos com o **extrato de levedura**, que contém grande número de vitaminas, coenzimas e nucleosídeos. O **hidrolisado de caseína**, feito de proteínas do leite, contém muitos aminoácidos e é usado para enriquecer certos meios. Pelo fato de o sangue conter muitos nutrientes necessários aos patógenos fastidiosos, o **soro** (parte líquida do sangue depois que os fatores da coagulação foram removidos), o sangue total e o sangue total aquecido podem ser úteis no enriquecimento de meios. O **ágar sangue** é útil na identificação de organismos que podem causar hemólise, ou rompimento das hemácias. O sangue do carneiro é usado porque sua

> Quadro 6.2 Meio sintético definido para o cultivo do *Proteus vulgaris*

| Ingrediente | Quantidade | Ingrediente | Quantidade |
|----------------------|------------|----------------------|------------|
| Água | 1 litro | K_2HPO_4 | 1 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 200 mg | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 10 mg |
| $CaCl_2$ | 10 mg | Glicose | 5 g |
| NH_4Cl | 1 g | Ácido nicotínico | 0,1 mg |

Oligoelementos (Mn, Mo, Cu, Co, Zn como sais inorgânicos, quantidades conhecidas de 0,02 — 0,5 mg cada)

Fonte: Adaptado de R.Y. Stanier et al. 1986. *The microbial world*. 5th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.



> Quadro 6.3 Meio sintético definido para o cultivo da bactéria fastidiosa *Leuconostoc mesenteroides*

| Ingrediente | Quantidade | Ingrediente | Quantidade |
|---------------------------------------|------------|---------------------------------------|------------|
| Água | 1 litro | | |
| Fonte de energia | | | |
| Glicose | 25 g | | |
| Fonte de nitrogênio | | | |
| NH ₄ Cl | 3 g | | |
| Minerais | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 600 mg | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 10 mg |
| K ₂ HPO ₄ | 600 mg | MnSO ₄ · 4H ₂ O | 20 mg |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 200 mg | NaCl | 10 mg |
| Ácido orgânico | | | |
| Acetato de sódio | 20 g | | |
| Aminoácidos | | | |
| DL-α-Alanina | 200 mg | L-Lisina · HCl | 250 mg |
| L-Arginina | 242 mg | DL-Metionina | 100 mg |
| L-Asparagina | 400 mg | DL-Fenilalanina | 100 mg |
| Ácido L-aspártico | 100 mg | L-Prolina | 100 mg |
| L-Cisteína | 50 mg | DL-Serina | 50 mg |
| Ácido L-glutâmico | 300 mg | DL-Treonina | 200 mg |
| Glicina | 100 mg | DL-Triptofano | 40 mg |
| L-Histidina · HCl | 62 mg | L-Tirosina | 100 mg |
| DL-Isoleucina | 250 mg | DL-Valina | 250 mg |
| DL-Leucina | 250 mg | | |
| Purinas e pirimidinas | | | |
| Sulfato de adenina · H ₂ O | 10 mg | Uracil | 10 mg |
| Guanina · HCl · 2H ₂ O | 10 mg | Xantina · HCl | 10 mg |
| Vitaminas | | | |
| Tiamina · HCl | 0,5 mg | Riboflavina | 0,5 mg |
| Piridoxina · HCl | 1,0 mg | Ácido nicotínico | 1,0 mg |
| Piridoxamina · HCl | 0,3 mg | Ácido p-aminobenzóico | 0,1 mg |
| Piridoxal · HCl | 0,3 mg | Biotina | 0,001 mg |
| Pantotenato de cálcio | 0,5 mg | Ácido fólico | 0,01 mg |

Fonte: H.E. Sauberlich e C.A. Baumann. "A factor required for the growth of *Leuconostoc citrovorum*." *J. Biol. Chem.* 176(1948):166.

hemólise é mais claramente definida do que quando o sangue humano é usado no meio de ágar. O **ágar chocolate**, feito com sangue aquecido, é assim chamado porque se torna marrom-chocolate. É usado para cultivar patógenos fastidiosos.

O ágar de suco de tomate, que é feito com o próprio suco de tomate, é usado para o cultivo de lactobacilos.

Meios Seletivos, Diferenciais e de Enriquecimento

Para isolar e identificar certos microrganismos, especialmente aqueles de pacientes com doenças infecciosas, são utilizados muitas vezes *meios seletivos, diferenciais e de enriquecimento*. Estes meios especiais são parte essencial dos modernos diagnósticos da microbiologia. O Quadro 6.5 mostra alguns exemplos de meios especiais de diagnóstico.

Um **meio seletivo** é aquele que favorece o crescimento de alguns organismos, mas suprime o crescimento de outros. Por exemplo, para identificar o *Clostridium botulinum* em amostras de alimentos suspeitas de serem agentes de envenenamento alimentar, os antibióticos sulfadiazina e sulfato de polimixina (*SPS — sulfadiazine and polymyxin sulfate*) são acrescentados às culturas anaeróbicas das espécies de *Clostridium*. Este meio de cultura é chamado *ágar SPS*. Ele permite o crescimento do *Clostridium botulinum*, ao passo que inibe o crescimento da maioria das outras espécies de *Clostridium*.

Um **meio diferencial** possui um constituinte que causa uma mudança observável (uma mudança de cor ou de pH) no meio quando ocorre uma reação bioquímica específica. Esta mudança permite aos microbiologistas distinguirem um determinado tipo de colônia de outros que crescem na mesma placa. O ágar SPS também serve como meio diferencial. As colônias de *Clostridium botulinum* formadas neste meio são escuras, devido ao sulfeto de hidrogênio produzido pelos organismos a partir dos aditivos que contêm enxofre.

Muitos meios, tais como o ágar SPS e o ágar MacConkey, são ao mesmo tempo seletivos e diferenciais. O *ágar MacConkey* contém cristal violeta e sais biliares, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, ao mesmo tempo que permitem o crescimento de bactérias Gram-negativas. O ágar MacConkey também contém o açúcar lactose e um indicador de pH que torna as colônias fermentadoras de lactose vermelhas e deixa as colônias não-fermentadoras sem cor ou translúcidas. Apesar de haver algumas exceções, a maioria dos organismos que são normalmente encontrados nos intestinos humanos fermenta a lactose, ao passo que a maior parte dos patógenos (microrganismos causadores de doenças) não o faz.

Um **meio de enriquecimento** contém nutrientes especiais que permitem o crescimento de um organismo específico que não deve estar presente em número suficiente para permitir ser isolado e identificado. Ao contrário de um meio seletivo, um meio de enriquecimento não suprime outros microrganismos. Por exemplo, pelo fato de os organismos da *Salmonella typhi* não serem suficientemente numerosos para permitir uma identificação em uma amostra fecal, eles são cultivados em um meio contendo o oligoelemento selênio, que favorece seu crescimento. Após a incubação no meio de enriquecimento, o aumento no número de organismos possibilita uma melhor identificação.

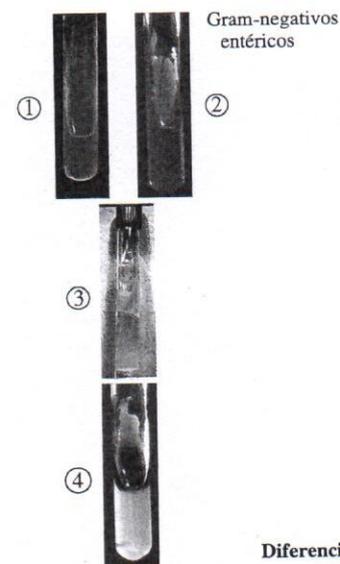
> Quadro 6.4 Meio complexo adequado a muitos organismos heterotróficos

| Ingredientes do caldo nutritivo | Quantidade |
|---|------------|
| Água | 1 litro |
| Peptona | 5 g |
| Extrato de carne | 3 g |
| NaCl | 8 g |
| Meio solidificado | |
| Ágar | 15 g |
| Ingredientes acima nas quantidades especificadas. | |

➤ **Quadro 6.5** Exemplos selecionados de meios de diagnóstico

| Meio | Organismo(s) identificado(s) | Seletividade e/ou diferenciação alcançada |
|------------------------------------|------------------------------|---|
| Ágar verde brilhante | <i>Salmonella</i> | Seletivo: O corante verde brilhante inibe as bactérias Gram-positivas e, assim, seleciona aquelas Gram-negativas. Diferencial: Diferencia as colônias de <i>Shigella</i> (que não fermentam a lactose nem a sacarose e são de cor vermelha a branca) de outros organismos que fermentam um daqueles açúcares e são de cor amarela a verde. |
| Ágar eosina azul de metileno (EMB) | Gram-negativos entéricos | Seletivo: O meio inibe parcialmente as bactérias Gram-positivas. Diferencial: A eosina e o azul de metileno diferenciam os organismos: as colônias de <i>Escherichia coli</i> são roxas e normalmente possuem um brilho verde metálico; as colônias de <i>Enterobacter aerogenes</i> são cor-de-rosa, indicando que fermentam a lactose; e as colônias de outros organismos são cor-de-rosa claras, indicando que não fermentam a lactose. |
| Ágar MacConkey | Gram-negativos entéricos | Seletivo: O cristal violeta e os sais biliares inibem as bactérias Gram-positivas. Diferencial: A lactose e o indicador de pH vermelho neutro (vermelho, quando ácido) identificam os fermentadores de lactose como colônias vermelhas e os não-fermentadores como cor-de-rosa claras. A maioria dos patógenos intestinais é de não-fermentadores e, portanto, não produz ácido. |

Ágar ferro-açúcar triplo
(triple sugar-iron agar — TSI)



Gram-negativos entéricos

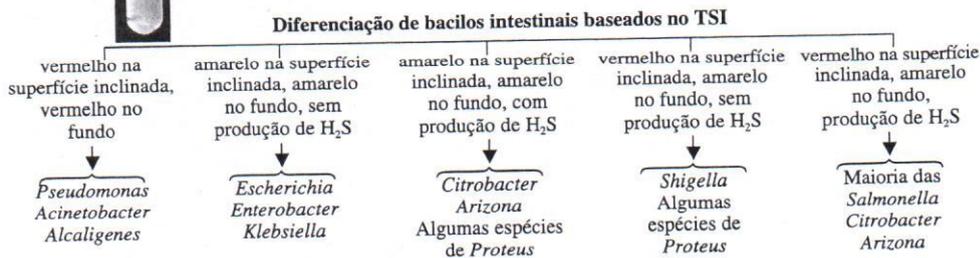
Seletivo:
O cristal violeta e os sais biliares inibem as bactérias Gram-positivas.

Diferencial:
A lactose e o indicador de pH vermelho neutro (vermelho, quando ácido) identificam os fermentadores de lactose como colônias vermelhas e os não-fermentadores como cor-de-rosa claras. A maioria dos patógenos intestinais é de não-fermentadores e, portanto, não produz ácido.

Não-seletivo.

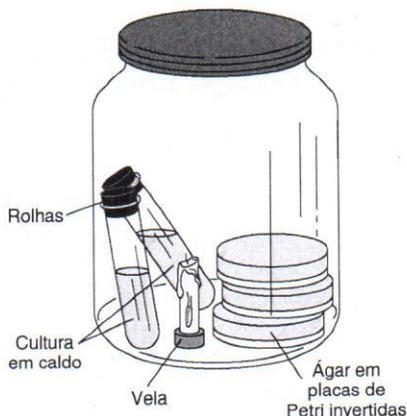
Diferencial:
Utilizados em tubos de ágar inclinados (tubos colocados em posição inclinada), onde a diferenciação é baseada tanto no crescimento aeróbico na superfície quanto no crescimento anaeróbico no ágar, na base do tubo. O meio contém quantidades específicas de glicose, sacarose e lactose, aminoácidos contendo enxofre, ferro e um indicador de pH; logo, o uso relativo de cada açúcar e a formação de H₂S podem ser detectados.

1. Tubo de TSI não-inoculado
2. Inoculado: vermelho na superfície inclinada e vermelho no fundo = não houve mudança; nenhum açúcar foi fermentado
3. Amarelo na superfície inclinada e amarelo no fundo = a lactose e a glicose foram fermentadas, produzindo ácido; as bolhas presas no fundo indicam fermentação com produção de ácido e gás
4. Vermelho na superfície inclinada (lactose não-fermentada) e amarelo no fundo (glicose fermentada a ácidos); precipitado preto = H₂S produzido; às vezes encobre o fundo amarelo. Quase todos os patógenos entéricos produzem coloração vermelha na superfície inclinada e amarela no fundo, com ou sem H₂S e/ou gases.



Controle da Quantidade de Oxigênio do Meio

As bactérias aeróbias e anaeróbias obrigatórias e as microaerófilas necessitam de atenção especial para que sejam mantidas as concentrações de oxigênio adequadas ao seu crescimento. A maioria dos aeróbios obrigatórios obtém oxigênio suficiente do caldo nutritivo ou da superfície do meio de ágar solidificado, mas alguns precisam de mais. O gás oxigênio é borbulhado através do meio ou dentro do ambiente de incubação com filtros entre a fonte de gás e o meio, para impedir a contaminação da cultura. Os microaerófilos podem ser incubados em tubos de um meio nutriente, ou em placas de ágar em uma jarra na qual, antes de ser fechada, **é acesa uma vela** (> Fig. 6.20). **(Velas perfumadas não devem ser usadas, pois seus óleos inibem o crescimento bacteriano.) A vela acesa consome o oxigênio da jarra e acrescenta-lhe dióxido de carbono. Quando o dióxido de carbono apaga a chama, as condições estão ótimas para o crescimento dos microrganismos que requerem pequenas quantidades de dióxido de carbono, tais como a bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, que causa a gonorréia.**



> Fig. 6.20 Cultura de anaeróbios e microaerófilos em jarra com vela. Os microaerófilos estão crescendo em tubos de ensaio e em placas de Petri em uma jarra selada, onde uma vela queimou até ser apagada pelo acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera da jarra. Uma pequena quantidade de oxigênio ainda permanece. Apesar de este método não ser mais usado, antigamente era o principal meio de fazer crescer anaeróbios.

Não Saia de Casa sem Seu CO₂

Às vezes, o transporte de espécimes de pacientes para o laboratório é problemático. Os organismos não devem ser submetidos a condições secas, nem a muito ou pouco oxigênio. Evidentemente, os manipuladores dos espécimes devem estar protegidos de infecções. Culturas que possam conter *Neisseria gonorrhoeae*, obtidas de pacientes com gonorréia, causam um problema deste tipo, ao proporcionarem uma atmosfera relativamente alta de dióxido de carbono. Existem sistemas comerciais disponíveis como o JEMBEC (John E. Martin Biological Environmental Chamber). Este sistema consiste em uma pequena placa de plástico contendo meio seletivo e uma pastilha de bicarbonato de sódio e ácido cítrico. A placa é inoculada e a pastilha é adicionada. A placa é então colocada em uma bolsa plástica, que é fechada. A umidade vinda do meio faz a pastilha liberar dióxido de carbono; é obtida uma concentração apropriada de 5 a 10%. A cultura é incubada de modo a permitir o início do crescimento antes do transporte para o laboratório.

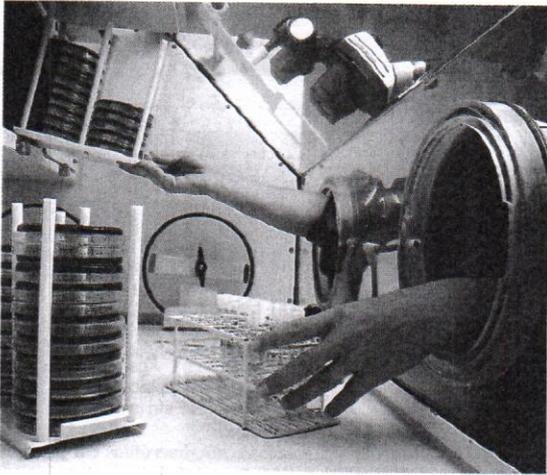


Para cultivar os anaeróbios obrigatórios, todo o oxigênio molecular deve ser removido e mantido fora do meio. A adição ao meio de agentes que se ligam ao oxigênio, tais como o tioglicolato, o aminoácido cisteína ou o sulfeto de sódio, impede que o oxigênio cause efeitos tóxicos aos anaeróbios. Os meios podem ser distribuídos em tubos selados com tampas de rosca e completamente cheios, de modo a expulsar o ar, ou podem também ser distribuídos em placas de Petri. Quando for necessário realizar culturas em placas para que o crescimento da colônia possa ser estu-

do, utilizam-se jarras especiais que possam conter tanto placas quanto tubos. As placas de ágar são incubadas em jarras seladas contendo substâncias químicas que removem o oxigênio do ar e geram dióxido de carbono (> Fig. 6.21). Culturas em camada alta de ágar podem ser produzidas introduzindo-se uma agulha de inoculação recoberta de organismos em um tubo com meio de ágar sólido. Em laboratórios onde os anaeróbios são regularmente manipulados, utiliza-se com frequência uma câmara de anaerobiose



> Fig. 6.21 Incubadora de CO₂. Quando ativados, estes reagentes químicos removem o oxigênio e são colocados junto às culturas em uma jarra lacrada para criar uma câmara anaeróbica. Este sistema é útil para um laboratório pequeno que possua apenas poucas placas a serem incubadas anaerobicamente.



> Fig. 6.22 Transferência anaeróbica. Uma grande câmara de transferência com vedação de ar para introdução de equipamentos e culturas e com aberturas que permitem a manipulação das culturas.

(> Fig. 6.22). O equipamento e as culturas são introduzidos na câmara através de um vedador de ar, e o técnico faz uso de luvas acopladas para manipular as culturas.

Manutenção das Culturas

Uma vez isolado, um organismo pode ser mantido indefinidamente em uma cultura pura, chamada **cultura de estoque**. Quando se quer estudá-lo, uma amostra de uma cultura de estoque é inoculada em meio fresco. A cultura de estoque jamais é utilizada em estudos de laboratório. Entretanto, os organismos em culturas de estoque passam pelas fases de crescimento, esgotam os nutrientes e acumulam resíduos, como qualquer outra cultura. À medida que ela envelhece, os organismos podem adquirir formas estranhas ou outras características alteradas. As culturas de estoque são mantidas produzindo-se subculturas em meio fresco a intervalos frequentes, para se manter o crescimento dos organismos.

O uso adequado das técnicas assépticas é importante na manipulação de todas as culturas. As **técnicas assépticas** minimi-

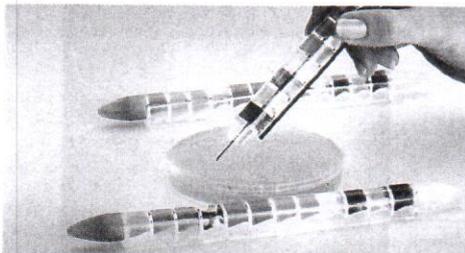
zam a possibilidade de as culturas serem contaminadas por organismos vindos do ambiente e impedem que os organismos, especialmente os patógenos, escapem para o meio. Estas técnicas são especialmente importantes para fazer subculturas de culturas de estoque. De outra forma, um organismo indesejável poderia ser introduzido, e o organismo de estoque teria de ser reisolado. Mesmo com transferências regulares de organismos de culturas de estoque para meios frescos, os organismos podem sofrer mutações (mudanças no DNA) e desenvolver características alteradas.

Culturas Preservadas

Para evitar o risco de contaminação e reduzir a taxa de mutação, os organismos de culturas de estoque também devem ser mantidos em uma **cultura preservada**, ou seja, uma cultura na qual os organismos são mantidos em estado inativo. A técnica mais frequentemente usada para preservar culturas é a **liofilização** (congelamento a seco), na qual as células são rapidamente congeladas, desidratadas enquanto se congelam e lacradas em frascos sob vácuo (Cap. 12). Estas culturas podem ser mantidas à temperatura ambiente indefinidamente.

Pelo fato de os microrganismos frequentemente sofrerem mudanças genéticas, são mantidas culturas de referência. Uma **cultura de referência** é uma cultura preservada que mantém os organismos com as características originalmente definidas. As culturas de referência de todas as espécies e variedades de bactérias conhecidas e de muitos outros microrganismos estão guardadas na Coleção Americana de Culturas Típicas (American Type Culture Collection), e muitas também são mantidas em universidades e centros de pesquisa. Assim, caso as culturas de estoque em um laboratório específico sofram mudanças, ou caso

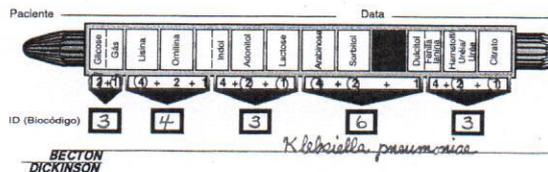
- ✓ Por que os endosporos não são considerados uma forma de reprodução? Por que o fato de esperar a ocorrência de condições desfavoráveis para iniciar a formação de esporos coloca um organismo sob maior risco do que outro que forma esporos continuamente?
- ✓ Diferencie os vários tipos de meios: sintético, complexo, definido, seletivo, diferencial, enriquecido e de transporte. É possível que um dado meio seja mais de um destes tipos ao mesmo tempo?
- ✓ Qual o objetivo de uma cultura de estoque? Por que ela não é usada para testes de laboratório?



> Fig. 6.23 O Sistema de Multiensaio por Enterotubagem (Enterotube Multitest System). (a) A remoção de uma tampa estéril permite que se "retire" uma colônia da superfície de uma placa. O fio metálico de inoculação é então deslocado por todos os compartimentos, inoculando assim cada um deles. (b) Após a inoculação e a incubação, os compartimentos com resultados positivos são marcados com um número. Os números são somados dentro de zonas, para dar um número indicador definitivo, que identifica um organismo na lista do manual de códigos. Quaisquer testes confirmatórios necessários são também aí registrados. Numerando-se cada teste em uma zona com um dígito igual a uma potência de 2 (1, 2, 4, 8 e assim por diante), a soma de qualquer conjunto de reações positivas resulta em um único número. Uma dada espécie pode, entretanto, ser codificada por muitos números diferentes, já que cepas individuais dessa espécie irão variar um pouco em suas características.

BBL® Enterotube™ II

4343128



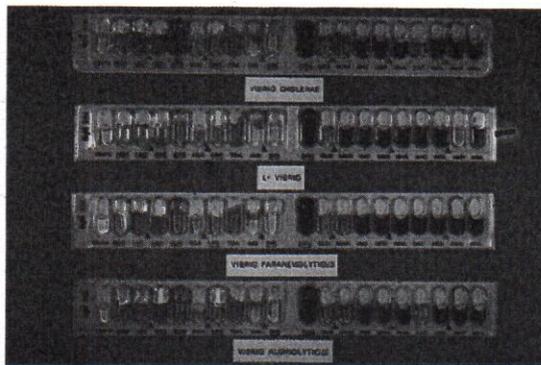
BECTON DICKINSON

outros laboratórios queiram obter determinados organismos para estudo, as culturas de referência estão sempre disponíveis.

Métodos de Realizar Múltiplos Ensaios de Diagnóstico

Muitos laboratórios de diagnóstico utilizam sistemas de cultura que contêm um grande número de meios diferenciais e seletivos, tais como o Sistema de Multiensaio por Enterotubagem (Enterotube Multitest System) ou o Índice do Perfil Analítico (*Analytical Profile Index* — API). Estes sistemas permitem a determinação simultânea da reação de um organismo a uma variedade de meios de diagnóstico cuidadosamente escolhidos a partir de uma única inoculação. As vantagens destes sistemas são de que eles utilizam pequenas quantidades de meios, ocupam pouco espaço em uma incubadora e proporcionam um meio eficiente e confiável de se fazer a perfeita identificação dos organismos infecciosos.

O Enterotube System® é usado para identificar patógenos entéricos ou organismos que causam doenças intestinais como as febres tifóide e paratífóide, a shigelose, a gastroenterite e alguns tipos de envenenamento alimentar. Os organismos causadores são todos bastonetes Gram-negativos indistinguíveis uns dos outros sem testes bioquímicos. O Enterotube System consiste em um tubo com compartimentos, cada um contendo um ou mais meios diferentes, e um bastão inoculador estéril (> Fig. 6.23a). Cada compartimento é inoculado quando a extremidade do bastão toca uma colônia e o bastão é deslocado pelo tubo. Após o tubo ser incubado por 24 horas a 37°C, os resultados de 15 testes bioquímicos podem ser obtidos observando-se (1) se foi produzido gás e (2) a cor do meio em cada compartimento. Os testes são agrupados em conjuntos de três; dentro de cada grupo são designados, aos testes, os números 1, 2 ou 4 (> Fig. 6.23b). A soma dos números dos testes positivos de cada grupo indica quais os testes que são positivos. A soma 3 significa que os testes 1 e 2 foram positivos; a soma 5 indica que os testes 1 e 4 foram positivos; a soma 6, que os testes 2 e 4 foram positivos; e a soma 7, que todos os testes foram positivos. As somas de um único dígito para cada um dos cinco grupos de teste são combinadas para formar um número de identificação de cinco dígitos para um organismo específico. Por exemplo, 36601 refere-se à *Escherichia coli*, e 34363



> Fig. 6.24 Sistema 20E do Índice do Perfil Analítico (*Analytical Profile Index* — API). Várias espécies do gênero *Vibrio* são aqui mostradas, com as diferenças nas reações que lhes permitem ser identificadas. Este sistema permite a identificação de 125 espécies de bacilos intestinais Gram-negativos.

à *Klebsiella pneumoniae*. Uma lista dos números de identificação e seus organismos correspondentes é fornecida junto com o sistema.

O API consiste em uma bandeja plástica com 20 microtubos chamados *cúpulas*, cada um contendo um tipo diferente de meio desidratado (> Fig. 6.24). Cada meio é reidratado e inoculado com uma suspensão de bactérias de uma colônia isolada. Como ocorre com os Enterotubes, a bandeja é incubada, os resultados dos testes são determinados e os valores 1, 2 e 4 são somados por grupos de três testes. Um número característico de sete dígitos identifica o organismo.

Nesta breve discussão sobre sistemas de diagnóstico, consideramos apenas a ponta do *iceberg*. Dentre os vários outros testes disponíveis, uma grande quantidade está baseada nas propriedades imunológicas dos organismos. Consideraremos alguns deles quando discutirmos a imunologia ou os agentes de infecções específicas. Além disso, sabe-se bastante sobre quais organismos são propensos a infectar certos órgãos e tecidos humanos, e muitos testes de diagnóstico são realizados para distinguir os organismos encontrados nas secreções respiratórias, em amostras fecais, no sangue, em outros tecidos e nos fluidos do corpo.

Recapitulação

Crescimento e Divisão Celular

Crescimento Microbiano Definido

- O crescimento microbiano pode ser definido como um aumento ordenado da quantidade de todos os componentes celulares e do número de células de um organismo.
- Devido ao aumento limitado do tamanho da célula e à frequência da divisão celular, o crescimento dos microrganismos é medido pelo aumento do número de células.

Divisão Celular

- A maioria das divisões celulares nas bactérias ocorre por **divisão binária**, na qual o nucleóide se divide e a célula forma um septo transversal que separa a célula original em duas células.
- As células de levedura e algumas bactérias se dividem por **brotamento**, no qual uma célula nova e pequena se desenvolve a partir da superfície de uma célula preexistente.

Fases de Crescimento

- Em um **meio** rico em nutrientes (uma mistura de substâncias sobre ou dentro da qual os microrganismos crescem), as bactérias se dividem rapidamente. O tempo necessário para uma divisão é chamado **tempo de geração**. Este crescimento ocorre em uma **taxa exponencial** ou **logarítmica**.
- As bactérias introduzidas em um meio fresco e rico em nutrientes apresentam quatro principais fases de crescimento: (1) Na **fase lag**, os organismos são metabolicamente ativos — crescendo e sintetizando substâncias variadas, mas não aumentando de número. (2) Na **fase log**, os organismos se dividem em uma taxa exponencial, ou logarítmica, e com tempo de geração constante. Estas propriedades de crescimento na fase log podem ser usadas para calcular tanto o número de gerações quanto o tempo de geração. As culturas podem ser mantidas através do uso de um **quimioestato**, que permite a adição contínua de meio fresco. (3) Na **fase estacionária**, o número de células produzidas

igual-se ao número de células que morrem. O meio contém quantidades limitadas de nutrientes e pode conter quantidades tóxicas de resíduos. (4) Na **fase de declínio**, ou **fase de morte**, muitas células perdem a capacidade de se dividir e eventualmente morrem. O resultado é uma diminuição logarítmica do número de células.

- Em geral, o crescimento em colônias compara-se àquele no meio líquido, exceto pelo fato de a maior parte do crescimento ocorrer na extremidade da colônia e porque todas as fases de crescimento ocorrem simultaneamente em algum lugar na colônia.

Medida do Crescimento Bacteriano

- O crescimento pode ser medido pela **diluição em série**, na qual são preparadas diluições sucessivas de 1:10 a partir de uma cultura líquida de bactérias e, depois, estas são transferidas para uma **placa de ágar**; as colônias que surgem são contadas. Cada colônia representa uma célula viva da amostra original.
- O crescimento também pode ser medido por **contagens microscópicas diretas**, pela técnica do **número mais provável**, pela **filtração**, pela observação ou medição da **turbidez**, pela medição de produtos do metabolismo e pela obtenção do peso seco das células.

Fatores que Afetam o Crescimento Bacteriano

Fatores Físicos

- A acidez e a alcalinidade do meio afetam o crescimento, e a maioria dos organismos possui uma faixa de **pH ótimo** de não mais do que uma unidade de pH.
- A temperatura afeta o crescimento bacteriano. (1) A maioria das bactérias pode crescer a uma faixa de temperatura superior a 30°C. (2) As bactérias podem ser classificadas, de acordo com a temperatura de crescimento, em três categorias: **psicrófilas**, que crescem a baixas temperaturas (abaixo de 25°C); **mesófilas**, que crescem melhor a temperaturas entre 25 e 40°C; e **termófilas**, que crescem a altas temperaturas (acima de 40°C). (3) A faixa de temperatura de um organismo está estritamente relacionada à temperatura na qual suas enzimas funcionam melhor.
- A quantidade de oxigênio no meio ambiente afeta o crescimento das bactérias. (1) As **aeróbias obrigatórias** necessitam de quantidades relativamente grandes de oxigênio molecular livre para crescer. (2) As **anaeróbias obrigatórias** são mortas pelo oxigênio livre e devem ser cultivadas na ausência dele. (3) As **anaeróbias facultativas** podem metabolizar substâncias aerobicamente, se houver oxigênio disponível, ou anaerobicamente, na ausência de oxigênio. (4) As **anaeróbias aerotolerantes** metabolizam substâncias anaerobicamente, mas não são prejudicadas pelo oxigênio livre. (5) As **microaerófilas** devem ser cultivadas com pequenas quantidades de oxigênio.
- Bactérias metabolicamente ativas necessitam de um pouco de água em seu ambiente.
- Algumas bactérias, mas nenhum outro ser vivo, podem suportar **pressões hidrostáticas** extremas em vales profundos dos oceanos.
- A pressão osmótica afeta o crescimento bacteriano, e a água pode ser atraída para dentro ou para fora das células, de acordo com a pressão osmótica relativa criada por substâncias dissolvidas na célula e no meio ambiente. (1) O transporte ativo minimiza os efeitos da alta pressão osmótica no meio ambiente. (2) As bactérias chamadas **halófilas** necessitam de sal em quantidades que variam de moderada a grande e são encontradas em oceanos e em águas excepcionalmente salgadas.

Fatores Nutricionais

- Todos os organismos necessitam de uma fonte de carbono: (1) Os autótrofos usam o CO₂ e sintetizam outras substâncias de que

precisam. (2) Os heterótrofos precisam de glicose ou de outra fonte orgânica de carbono a partir da qual obtêm energia, bem como de intermediários para o processo de síntese.

- Os microrganismos necessitam de fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico a partir das quais sintetizam proteínas e ácidos nucleicos. Também requerem fontes de outros elementos encontrados dentro deles, inclusive enxofre, fósforo, potássio, ferro e muitos **oligoelementos**.
- Os microrganismos que não possuem as enzimas para sintetizar **vitaminas** específicas devem obter estas vitaminas a partir do seu meio ambiente.
- As necessidades nutricionais de um organismo são determinadas pelo tipo e quantidade de suas enzimas. A **complexidade nutricional** reflete uma deficiência nas enzimas biossintéticas.
- As técnicas de bioensaio utilizam as propriedades metabólicas dos organismos para determinar quantidades de vitaminas e de outros compostos em alimentos e outros materiais.
- A maioria dos microrganismos transporta substâncias de baixo peso molecular através de sua membrana celular, metabolizando-as internamente. Algumas bactérias (e fungos) também produzem **exoenzimas**, que digerem grandes moléculas fora da membrana celular do organismo.
- Os microrganismos ajustam-se a suprimentos limitados de nutrientes aumentando as quantidades de enzimas que produzem, sintetizando as enzimas que metabolizam outros nutrientes disponíveis ou ajustando suas atividades metabólicas de modo a crescerem a uma velocidade condizente com a disponibilidade de nutrientes.

Esporulação

- A **esporulação**, que ocorre no *Bacillus*, no *Clostridium* e em alguns outros gêneros Gram-positivos, envolve os passos resumidos na Fig. 6.17.
- A esporulação permite à bactéria suportar longos períodos de seca e temperaturas extremas.
- Quando condições mais favoráveis são restabelecidas, ocorre a **germinação** — os endosporos começam a se transformar em células vegetativas.

Cultivo de Bactérias

Métodos de Obtenção de Culturas Puras

- O **método de estriamento em placas** para obter uma **cultura pura** envolve o estriamento das bactérias em uma superfície estéril e sólida, como por exemplo uma placa de ágar, para que a prole de uma única célula possa ser retirada da superfície e transferida para um meio estéril.
- O **método pour plate** de obter uma cultura pura envolve diluições em série, a transferência para ágar fundido de um volume específico da diluição contendo alguns organismos e a remoção de células de uma colônia do ágar.

Meios de Cultura

- Na natureza, os microrganismos crescem em meios naturais, ou nos nutrientes presentes na água, no solo e em material orgânico vivo ou morto.
- Em laboratório, os microrganismos crescem em **meio sintético**: (1) Um **meio sintético definido** é formado por quantidades conhecidas de nutrientes específicos. (2) Os **meios complexos** contêm nutrientes de composição razoavelmente conhecida que variam de composição de partida para partida.
- A maioria das culturas de rotina dos laboratórios faz uso das **peptonas**, isto é, proteínas digeridas de carne de boi ou de peixe. Às vezes são acrescentadas outras substâncias como o **extrato de levedura**, o **hidrolisado de caseína**, o **soro** ou sangue total, aquecido ou não.
- Os meios de diagnóstico são (1) os **meios seletivos**, se favorecem o crescimento de alguns organismos e inibem o crescimento de outros, (2) os **meios diferenciais**, se permitirem distinguir