**Módulo 2**

**T/P: Identificação de Bacilos Gram-negativos**

A picture containing drawing

Description automatically generated**A família Enterobacteriacea** inclui cerca de 30 gêneros bacterianos e mais de 100 espécies. Inclui bactérias endossimbiontes e bactérias patogênicas para o homem, animais e plantas.

Para sua iniciação em pesquisas com esta Família de bactérias, propomos a você um **DESAFIO**:

Suponha que você está no Laboratório de Aulas Práticas de Microbiologia e recebe tubos de 4 culturas bacterianas cultivas em meio líquido:

- *Escherichia coli*,

- *Salmonella* sp,

- *Shigella*,

- *Klebsiella*.

O seu **DESAFIO** é identificar estas 4 bactérias(Consulte o Quadro**: Provas Bioquímicas**

no final desta Prática)

**ETAPA 1**: BACTERIOSCOPIA - Você faz um esfregaço em lâmina de microscopia, realiza a Coloração de Gram, visualiza ao Microscópio Óptico (M.O.). Abaixo estão fotos de suas observações ao M.O. (**Fig.1**):

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** | **Bactéria 3** | **Bactéria 4** |
| Bactéria gram-negativa – Wikipédia, a enciclopédia livre | Bactéria gram-negativa – Wikipédia, a enciclopédia livre | 5. Gram negative bacilli (FMS3/Microbiology) Flashcards | Memorang | 5. Gram negative bacilli (FMS3/Microbiology) Flashcards | Memorang |
| **Fig 1**: Observações ao M.O. das 4 culturas bacterianas submetidas a coloração de Gram | | | |

A drawing of a cartoon character

Description automatically generated

Preencha aqui os resultados da Coloração de Gram:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1:** | Bacilo Gram-negativo |  | **Bactéria 3:** |  |
| **Bactéria 2:** |  |  | **Bactéria 4:** |  |

**ETAPA 2**: Já que as 4 bactérias são Bacilos Gram-negativos (BGN), vamos fazer as PROVAS BIOQUIMICAS adequadas para a identificação destas bactérias:

CULTIVO 1 – Semeadura em meio **Ágar MacConkey** vamos fazer o cultivo em meio Ágar MacConkey, pois desta forma poderemos: 1) fazer um repique das culturas, obtendo culturas frescas; 2) já realizar a primeira prova Bioquímica – Prova: verificar se a bactéria fermenta o açúcar lactose (**Fig.2**).

|  |  |
| --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** |
| Agar Mac Conkey com 10 Placas Laborclin - Cod. 12942 | Agar Mac Conkey com 10 Placas Laborclin - Cod. 12942 |
| **Bactéra3** | **Bactéria 4** |
| Agar Mac Conkey com 10 Placas Laborclin - Cod. 12942 | Agar Mac Conkey com 10 Placas Laborclin - Cod. 12942 |
| **Fig 2**: Realizar a semeadura por esgotamento das 4 culturas bacterianas em meio Ágar MacConkey. | |

**CULTIVO 2 - Semeadura em Meios Diferenciais: EPM, MILI, Citrato**

**A) Meio Ágar CITRATO DE SIMMONS (Fig. 5)**

**Prova 2**: CITRATO DE SIMMONS

Prova positiva: coloração azul

Prova negativa: coloração inalterada do meio (verde), ausência total de crescimento.

|  |  |
| --- | --- |
| Diagrama  Descrição gerada automaticamente | Interface gráfica do usuário, Texto, Aplicativo, Email  Descrição gerada automaticamente |

**Fig. 5**: Prova bioquímica do meio Citrato de Simmons.

**C) Meio de MILi (Motilidade, Indol e Lisina-descarboxilase)** (**Fig. 5**):

Os testes de Motilidade e L-Lisina descarboxilase são verificados na base.

**Prova 8**: MOTILIDADE

Prova positiva: meio turvo.

Prova negativa: meio límpido ou crescimento só no local do inoculo.

**Prova 9**: INDOL. É realizada adicionando-se algumas gotas do reativo de Kovacs

(dietilaminobenzaldeído) na superfície do cultivo.

Prova positiva: coloração vermelha.

Prova negativa: coloração amarela.

**Prova 10**: L-LISINA DESCARBOXILASE

Prova positiva: coloração roxa.

Prova negativa: coloração amarela.

**Diagrama

Descrição gerada automaticamente**

**Fig. 6**: Provas bioquímicas do meio MILi.

**D) Meio EPM (Escola Paulista de Medicina) (Fig. 6):**

**Prova 3:** Fermentação de GLICOSE:

Prova Positiva: base amarela.

Prova Negativa: base inalterada (verde)

Obs.: Todas as Enterobactérias são fermentadoras de glicose

**Prova 4**: Fermentação de GLICOSE com PRODUÇÃO DE GÁS.

Prova Positiva: base amarela, com presença de bolhas de ar.

Prova Negativa: base amarelada, sem bolhas de ar.

**Prova 5**: Produção de H2S:

Prova Positiva: base enegrecida – máscara (atrapalha) a leitura das provas: fermentação de GLICOSE, fermentação de GLICOSE com produção de gás, UREASE;

Prova Negativa: base não enegrecida.

**Prova 6**: Produção de UREASE:

Prova positiva: base inclinada azul.

Prova negativa: base inclinada amarela ou inalterada.

**Prova 7**: Produção de TRIPTOFANO DESAMINASE:

Prova Positiva: topo da inclinação verde escuro.

Prova Negativa: topo da inclinação azulado, amarelo ou inalterado.

Diagrama

Descrição gerada automaticamente

Tabela

Descrição gerada automaticamente com confiança baixa

**OBS: Resultados “fáceis” de serem analisados”**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Lac** | **Citrato** | **Motilidade** | **demais** |
| ***E. coli*** | **+** | **-** | **+/-** |  |
| ***Klebsiella*** | **+** | **+** | **-** |  |
|  |  |  |  |  |
| ***Salmonella*** | **-** | **+/-** | **+** |  |
| ***Shigella*** | **-** | **-** | **-** |  |

**RESULTADOS**

**RESULTADO DO CULTIVO no Meios Diferencial Ágar MacConkey (**(**Fig.**).

|  |  |
| --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** |
| Meios de cultura – Como diferenciar meios de cultura | Klebsiella pneumoniae on MacConkey Agar and Its Details |
| **Bactéra3** | **Bactéria 4** |
| Non-lactose fermenting colonies on MacConkey agar. | Download Scientific  Diagram | Bacterial Colonies Culture On MacConkey Agar Media. Stock Image - Image of  background, dish: 74599915 |
| **Fig** : Observações de cultivos das 4 culturas bacterianas em meio Ágar MacConkey. | |

A drawing of a cartoon character

Description automatically generatedPreencha aqui os resultados da Coloração de Gram:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1:** | **Lac +** |  | **Bactéria 3:** | **Lac -** |
| **Bactéria 2:** | **Lac +** |  | **Bactéria 4:** | **Lac -** |

**RESULTADO DO CULTIVO no Meios Diferencial Citrato (**(**Fig.**).

|  |  |
| --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** |
| Imagem em preto e branco  Descrição gerada automaticamente com confiança média ( **+ ou - ? \_\_\_\_-\_\_\_)** | Imagem em preto e branco  Descrição gerada automaticamente com confiança média **(+ ou - ?\_\_\_\_+\_\_\_\_)** |
| **Bactéra3** | **Bactéria 4** |
| Imagem em preto e branco  Descrição gerada automaticamente com confiança média **(+ ou - ?)\_\_\_\_\_ -\_\_\_)** | Imagem em preto e branco  Descrição gerada automaticamente com confiança média **( + ou - ?\_\_\_\_\_\_-\_\_\_)** |
| **Fig 2**: Realizar a semeadura por esgotamento das 4 culturas bacterianas em meio Ágar MacConkey. | |

E agora, você já sabe quem são as bactérias?

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1:** | **E. coli** |  | **Bactéria 3:** |  |
| **Bactéria 2:** | **Klebsiela** |  | **Bactéria 4:** |  |

**Então, vamos para mais Provas Bioquímicas 🡪**

**RESULTADO DO CULTIVO no Meios Diferencial MILI (**(**Fig.**).

|  |  |
| --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** |
| Garrafa de plástico  Descrição gerada automaticamente com confiança baixa | Uma imagem contendo Interface gráfica do usuário  Descrição gerada automaticamente**motilidade -** |
| **Bactéra3** | **Bactéria 4** |
| Uma imagem contendo Interface gráfica do usuário  Descrição gerada automaticamente | Interface gráfica do usuário, Texto  Descrição gerada automaticamente com confiança média |
| **Fig 2**: Realizar a semeadura por esgotamento das 4 culturas bacterianas em meio Ágar MacConkey. | |

E agora, você já sabe quem são as bactérias?

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1:** |  |  | **Bactéria 3:** |  |
| **Bactéria 2:** |  |  | **Bactéria 4:** |  |

**RESULTADO DO CULTIVO no Meios Diferencial EPM (**(**Fig.**).

|  |  |
| --- | --- |
| **Bactéria 1** | **Bactéria 2** |
|  |  |
| **Bactéra3** | **Bactéria 4** |
|  |  |
| **Fig 2**: Realizar a semeadura por esgotamento das 4 culturas bacterianas em meio Ágar MacConkey. | |

E agora, você já sabe quem são as bactérias?

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria 1:** |  |  | **Bactéria 3:** |  |
| **Bactéria 2:** |  |  | **Bactéria 4:** |  |