

T/P2: CULTIVO DE BACTÉRIAS EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS E COMPOSIÇÃO DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA BACTERIANOS

Profª. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)

(Dia 1 / 2: P1, P2, P3, Questões 1 e 2)

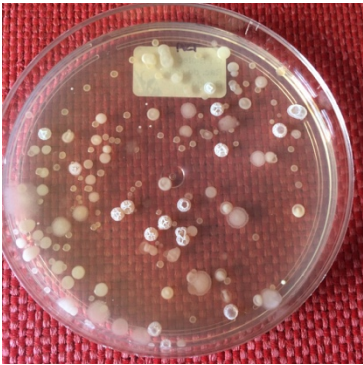


T1: Meios de cultura líquidos e sólidos – o que são e quando são usados

As bactérias podem ser cultivadas em meios de cultura líquidos e em meios de cultura sólidos. Hoje vamos ver como são empregados estes meios de cultura para o cultivo de bactérias.

Os cultivos de bactérias obtidos em **meios de cultura líquidos** são empregados em procedimentos de análise do crescimento bacteriano, isolamento de proteínas, DNA e de outros compostos produzidos por bactérias. As diferentes bactérias têm demandas metabólicas que podem ser muito diferentes assim, visando se conseguir um bom cultivo bacteriano, foram desenvolvidos uma grande variedade de diferentes meios de cultura (**Fig. 1A**).

Os **meios de cultura sólidos** têm a mesma composição química dos meios de cultura líquidos equivalentes, e a consistência sólida é obtida pelo acréscimo de 2% Ágar-ágar. Estes meios, após terem sofrido esterilização, são distribuídos em placas de Petri. Estes meios permitem a **observação visual das colônias** bacterianas crescidas sobre sua superfície, sendo que cada colônia bacteriana contém cerca de 1×10^9 células (**Fig. 1B**). Isto permite a observação macroscópica das colônias (rugosa/lisa; incolor/colorida; mucoide/não mucoide, etc.), a obtenção de colônias isoladas, análise de produção de halos ao redor das colônias que sejam resultantes da hidrólise de (ou reação com) algum substrato que esteja presente nas proximidades da colônia. Baseado nisto, vários meios de cultura diferenciais foram desenvolvidos, como veremos ao final desta Prática. Estes meios fornecem ferramentas auxiliares na **identificação** das bactérias.

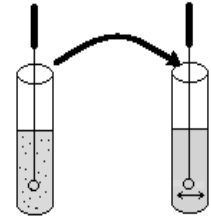
 Meios de cultura líquidos são empregados para: - Acompanhamento da curva de Crescimento, - Isolamento de moléculas, - Realização de provas bioquímicas e sorológicas, como: - Coagulase - Antes (límpido) e Depois (turvo) do cultivo bacteriano	 Meios de cultura sólidos são empregados para: - Obtenção de colônias microbianas isoladas, - Visualização da morfologia das colônias, - Obtenção de colônias isoladas; - Realização de provas bioquímicas como Antibiograma, DNase, etc
Fig.1 A: Cultivo de bactéria em meio de cultura líquido	Fig.1 B: Cultivo de microrganismos em meio de cultura sólido (há bactérias e fungos neste cultivo)

No decorrer desta Disciplina, serão empregadas várias composições de meios de cultura destes dois tipos, para várias finalidades. **Hoje** vamos ver como se faz a **semeadura** e o **cultivo** (propagação) de bactérias nestes meios.

P: SEMEADURA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A) Material:

- 1 cultura bacteriana de *E. coli*
- 1 tubo com meio de cultura líquido para bactérias (meio rico, Exs.: LB, NB, BHI)
- 1 placa com meio de cultura sólido para bactérias (meio rico, Exs.: LA, NA)
- 1 alça de platina
- 1 bico de Bunsen



P1: Sementeira em Meio de Cultura líquido - Procedimento

- Flambar a alça de platina, esperar esfriar próximo a chama,
- Abrir cuidadosamente a Cultura bacteriana,
- Introduzir a alça de platina na cultura bacteriana,
- Remover o tampão de algodão do tubo contendo meio de cultura a ser semeado,
- Flambar a boca do tubo recém-semeado, tampar com a rolha de algodão (girando),
- Ao final, flambar novamente a alça de platina.

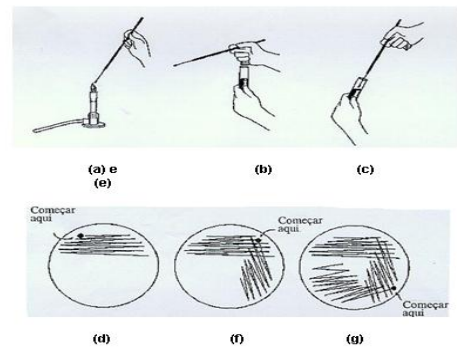
VÍDEO: [Sementeira e Cultivo de bactéria em meio líquido](#)



P2: Sementeira (por esgotamento) em Meio de Cultura Sólido – Procedimento

- Idem ao realizado acima,
- Com a alça de platina, delicadamente, semear na placa de Petri, conforme indicado no desenho,
- flambar novamente,
- esfriar a alça numa parte do meio sólido sem bactérias e a partir de um ponto já semeado, distribuir o material na placa,
- repita a operação e), f) fazendo estrias no restante da placa

Ao final, flambar novamente a alça de platina.

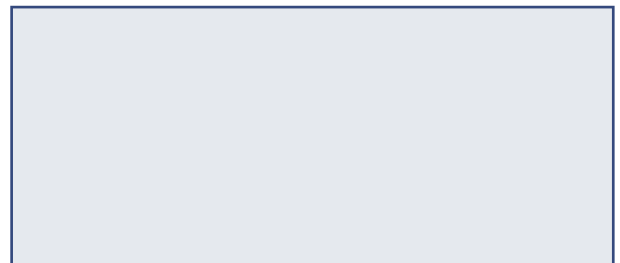
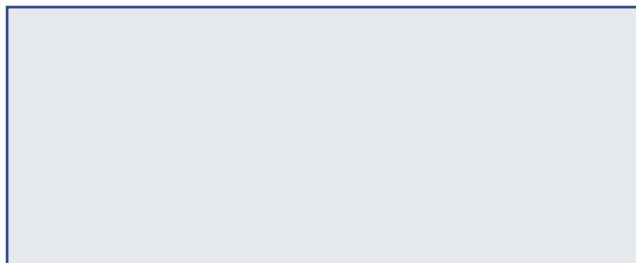


VIDEO: [Sementeira em meio sólido](#)



Resultados:

Desenhe e descreva os resultados de ambos os procedimentos.



QUESTÕES PARA ESTUDO 1

- Qual é a aparência do meio de cultura líquido estéril? Como ele fica após o crescimento bacteriano?
- Quais são os objetivos da sementeira de bactérias em meios de cultura líquidos e em meios de cultura sólidos? O que são colônias isoladas?

T2: Composição de alguns Meios de Cultura bacterianos

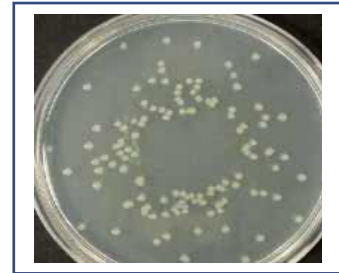
As diferentes bactérias têm exigências nutricionais diferentes para o seu cultivo. Há bactérias, como *E. coli* e *Bacillus subtilis* que são capazes de crescer em meios minerais, meios que tem composição química muito simples. Há outras bactérias que só são capazes de ser cultivadas em meio que contém hidrolisados de proteínas. Há ainda bactérias que são nutricionalmente mais exigentes e só são capazes de ser cultivadas em meios enriquecidos com sangue ou com outras substâncias. Abaixo são apresentados alguns destes meios mais utilizados.

1. Meio Mineral ou Mínimo

Contêm apenas sais minerais e uma fonte de carbono que é geralmente 0,5% de glicose. (cor: incolor transparente)

Exemplos:

- M9



2. Meio Completo ou Complexo

Contêm hidrolisado de proteína vegetal ou animal e uma fonte de carbono que é geralmente 0,5% de glicose. São utilizados para o cultivo de ampla variedade de bactérias. (cor: amarelo transparente)

Exemplos:

- Caldo Nutriente (NB) / Ágar Nutriente (NA)

- TSB / TSA

- LB / TSA

- Ágar Mueller-Hinton – utilizado nos Antibiógramas



3. Meio de cultura Diferencial

Os meios de **cultura Diferenciais** são empregados para auxiliar na etapa de identificação de bactérias. Exemplos:

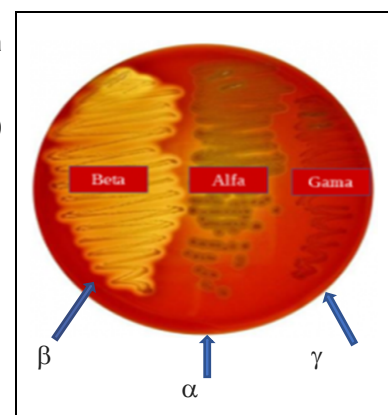
3.1. Exemplo: Ágar Sangue

Meio de cultura **Diferencial** (não é seletivo)

É rico em nutrientes e possui coloração vermelha intensa. É utilizado para cultivo primário de bactérias nutricionalmente mais exigentes.

Como meio diferencial, é muito empregado para a identificação tipo (padrão) de hemólise principalmente. de bactérias do gênero *Streptococcus*:

- α hemólise (hemólise parcial) - Ex. *S. viridans*, *S. pneumoniae*;
- β hemólise (hemólise total) - Ex. *S. pyogenes*, *S. agalactiae*
- γ hemólise (hemólise ausente) – Ex. *Enterococcus faecalis*



3.2. Exemplo: Ágar Chocolate

Meio de cultura **Diferencial** (não é seletivo) utilizado para cultivo de bactérias delicadas e exigentes. É feito com uma base e sangue de cavalo, carneiro ou coelho aquecidas suavemente até 56 ° C.

Contém **glóbulos vermelhos lisados** (rompidos) para liberar **hemina**, **NAD** e **hematina** que dão a coloração marrom característica.

É empregado para o cultivo e isolamento de diversos microrganismos fastidiosos (nutricionalmente exigentes), como: *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.*



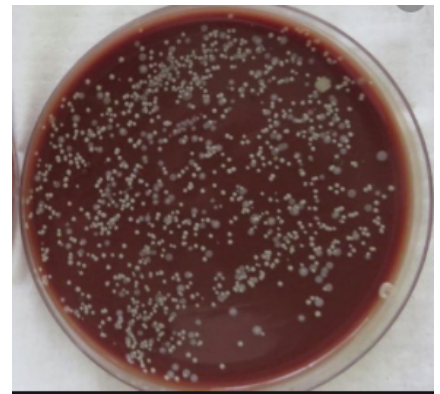
4. Meio de cultura Seletivo

Os meios de **cultura Seletivos** são empregados para auxiliar na etapa de isolamento de bactérias. Exemplo:

4.1. Exemplo Ágar Thayer-Martin chocolate

É um meio de cultura que permite o crescimento e isolamento de ***Neisseria gonorrhoeae*** e de ***Neisseria meningitidis***.

É constituído por sangue desfibrinado de carneiro e antibióticos (vancomicina + colistina + trimetoprim) e fatores de crescimento.



5. Meio Diferencial e Seletivo

Os meios de **cultura Seletivos** e **Diferenciais** são muito empregados para auxiliar na etapa de isolamento e identificação de bactérias. Exemplos:

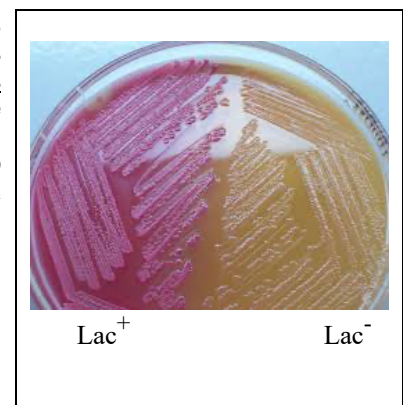
5.1. Exemplo: Ágar MacConkey

É um meio de **cultura seletivo** destinado ao **crescimento de bactérias Gram-negativas**. Isso ocorre porque ele possui em sua composição duas substâncias que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas: sais biliares e cristal violeta. Assim, ele favorecerá somente o crescimento de bactérias Gram-negativas.

É um meio de **cultura diferencial**. Sua formulação contém como único açúcar a lactose e o indicador de pH vermelho neutro e, por isto, permite a diferenciação visual das bactérias Lac^+ das Lac^- :

- **Fermentadoras de lactose (Lac^+)**, que originam colônias vermelhas, como: *E. coli*

- **Não fermentadoras de lactose (Lac^-)**, que formam colônias brancas como: *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*



5.2. Exemplo: Ágar Manitol-salgado

É utilizado para o isolamento seletivo de estafilococos e para a detecção de *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras clínicas.

É um meio de **cultura seletivo**: Contém peptonas e extrato de carne bovinos, que fornecem nutrientes essenciais; e, 7,5% de cloreto de sódio, que resulta na inibição parcial ou completa de outras bactérias que não os estafilococos.

É um meio de **cultura diferencial**: Sua formulação contém o açúcar manitol. A fermentação de manitol resulta na alteração no indicador de pH vermelho de fenol, na diferenciação das espécies de estafilococos.

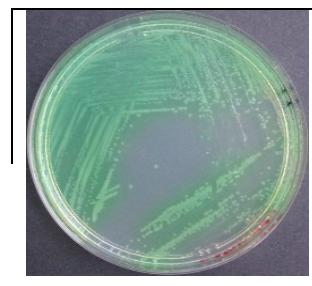
- Os estafilococos coagulase-positiva produzem colônias amarelas e um meio amarelo circundante. Exemplo: *Staphylococcus aureus*.

- Os estafilococos coagulase-negativa produzem colônias vermelhas e nenhuma alteração na cor do indicador vermelho de fenol. Exemplo: *Staphylococcus epidermidis*.



5.3. Exemplo: Ágar Cetrimide

O Ágar Cetrimide é um **meio seletivo** para o isolamento e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras biológicas de origem animal e produtos farmacêuticos e cosméticos. A fórmula deste meio foi derivada do meio **King A**, favorecendo a produção de **piocianina** por *Pseudomonas aeruginosa*.



Cetrimide (brometo de cetiltrimetilamônio) é um composto de amônio quaternário que inibe o crescimento de muitas bactérias incluindo espécies de *Pseudomonas* exceto *Pseudomonas aeruginosa*. A produção de piocianina (um pigmento azul, não-fluorescente, solúvel em água e clorofórmio) é estimulada pelo cloreto de magnésio e sulfato de potássio. O meio também favorece a produção de pigmentos fluorescente (pioverdinas) por algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. A maioria das espécies de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser identificada pelo odor característico parecido com o de frutas como uva (aminoacetofenona).

Alguns Resultados, são suspeitos como positivos, mas podem ser confirmados:

- ♣ colônias com uma pigmentação característica **azul** ou **azul esverdeada** rodeando as colônias e que se tornam **fluorescente sob a luz ultravioleta de 254 nm**;
- ♣ colônias mucosas acinzentadas, pigmentadas ou não.
- ♣ A presença da **piocianina** pode ser confirmada por extração com clorofórmio. *Pseudomonas aeruginosa* tipicamente produz ambos **piocianina e fluoresceína**.
- ♣ Ocasionalmente, cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providência*, *Alcaligenes* e *Aeromonas* podem crescer também, causando um **ligeiro amarelamento** do meio. Esta cor é facilmente diferenciada da produção de fluoresceína, uma vez que não forma fluorescência.
- ♣ Crescimento a 42°C: positivo.

P3: Semeadura em Meio de cultura Diferencial e Seletivo

Os meios de **cultura Seletivos e Diferenciais** são empregados para auxiliar na etapa de isolamento e identificação de bactérias.

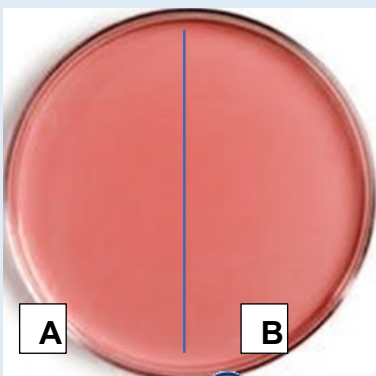
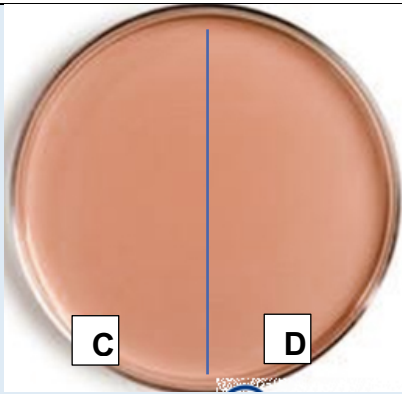
Material:

1. Duas culturas de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e outra *Salmonella* sp ou *Shigella* sp);
2. Duas culturas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*);
3. Uma placa com meio sólido Ágar MacConkey – marcada com uma divisão ao meio
4. Uma placa com meio sólido Ágar Manitol-salgado - marcada com uma divisão ao meio;
5. Alça de platina, Bico de Bunsen, Estufa a 37° C

Procedimento:

1. Usando alça de platina, inocular por esgotamento (procurando obter colônias isoladas), nas placas contendo os meios sólidos diferenciais e seletivos:
 - Em Ágar MacConkey, as duas bactérias **Gram-negativas**: *E. coli* e *Salmonella* sp;
 - Em Ágar Manitol-salgado, as duas bactérias **Gram-positivas**: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*;
3. Incubar as placas a, em estufa a 37° C, por 16 horas;
4. Guardar as placas em geladeira, até o dia da leitura e análise.

Resultados: Apresente a análise das colônias crescidas em cada um dos meios de cultura na figura abaixo:

	
Semeadura em meio sólido diferencial e seletivo Ágar MacConkey , de: A) <i>E. coli</i> , B) <i>Salmonella</i> sp	Semeadura em meio sólido diferencial e seletivo Ágar Manitol-salgado , de: C) <i>Staphylococcus aureus</i> , D) <i>Staphylococcus epidermidis</i>

QUESTÕES PARA ESTUDO 2



Vamos conferir?

1. Por que para o cultivo de *E. coli* e de *Salmonella* foi empregado o meio Ágar-MacConkey e não o meio Ágar-Manitol salgado?
2. Por que para a diferenciação de *S. aureus* e de *S. epidermidis* foi empregado o meio Ágar-Manitol salgado e não Ágar-MacConkey?
3. Na prática laboratorial, que procedimento prévio é necessário ser feito antes da decisão de inocular uma bactéria em um desses meios. Ou seja, se estivermos diante de 4 tubos cada um deles contendo cultura de uma das bactérias analisadas, qual procedimento deve ser realizado antes de escolher em qual dos meios seletivos e diferenciais utilizar.
4. Discuta a importância do emprego de meios seletivos e diferenciais para o isolamento e identificação preliminar de uma bactéria.