

PRÁTICA: Emprego de Meios Diferenciais e Seletivos no cultivo de bactérias

Nesta prática alguns meios de cultura Diferenciais e Seletivos serão empregados para o cultivo de bactérias.

Objetivo: Aprender como são empregados meios de cultura seletivos Seletivos e Diferenciais para auxiliar o isolamento e identificação de bactérias.

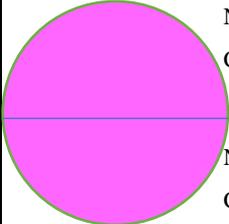
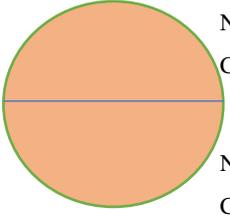
Material:

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 as duas bactérias Gram-negativas na placa com Ágar MacConkey, procurando obter colônias isoladas;
2. Usando alça de platina, inocular as duas bactérias Gram-positivas na placa com Ágar Manitol-salgado, procurando obter colônias isoladas;
3. Incubar as placas a, em estufa a 37 °C, por 16 horas. Guardar as placas em geladeira até o dia da leitura e análise.

Resultados:

Ágar MacConkey	Ágar Manitol-salgado
 <p>Nome da bactéria: _____ Cor das colônias: _____</p> <p>Nome da bactéria: _____ Cor das colônias: _____</p>	 <p>Nome da bactéria: _____ Cor das colônias: _____</p> <p>Nome da bactéria: _____ Cor das colônias: _____</p>

Interpretação:

Considerando as descrições dos meios apresentadas nas páginas seguintes, analise os resultados obtidos e deixe aqui abaixo os seus comentários.

Questões para Estudo:

1. Os meios de cultura bacterianos completo (ou complexo) - como: **NB** (Caldo Nutriente) e **NA** (Agar Nutriente); **TSB** ("Trypticase soy broth") e **TSA** ("Trypticase soy agar") contêm hidrolisado de proteínas. É correto afirmar que todas as bactérias de importância médica crescem nestes meios? Justifique sua resposta.
2. Qual é a diferença entre um meio de cultura bacteriano completo (ou complexo), um meio de cultura diferencial e um meio de cultura seletivo? Para que finalidades estes meios são empregados?
3. Suponha que você acabou de isolar uma bactéria de um paciente, fez a coloração de Gram e verificou se tratar de **um bacilo Gram-negativo**. Para prosseguir a identificação desta bactéria, você inocularia em meio Ágar MacConkey ou em Ágar Manitol-salgado. Justifique.
4. Suponha agora que outro isolado seja um coco Gram-positivo. Neste caso, em qual dos meios acima mencionados você faria a semeadura?

DESCRIÇÃO DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA DE BACTÉRIAS

A) Meio de Cultura Líquido e Meio de Cultura Sólido

Os meios de cultura sólido têm a mesma composição dos meios de cultura líquidos equivalentes e são sólidos porque são acrescidos de 2% Ágar-ágar.

Meio de cultura líquido (caldo em tubos)	Meio de cultura sólido (em placas de Petri)
 <p>É empregado para:</p> <ul style="list-style-type: none">- Acompanhamento da curva de Crescimento,- Isolamento de moléculas, <p>Antes e depois do cultivo bacteriano</p>	 <p>É empregado para:</p> <ul style="list-style-type: none">- Obtenção de colônias microbianas isoladas,- Isolamento de bactérias

B) Composição dos Meios de Cultura

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



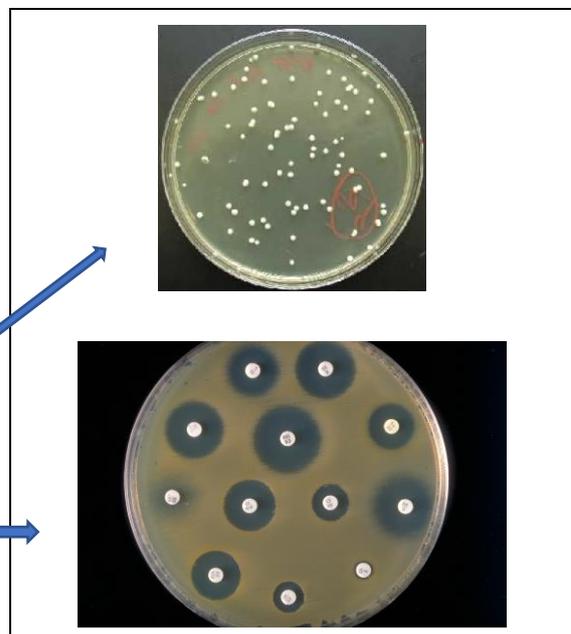
2. Meio Completo ou Complexo

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 Antibiogramas



3. Meio Diferencial

Exemplos:

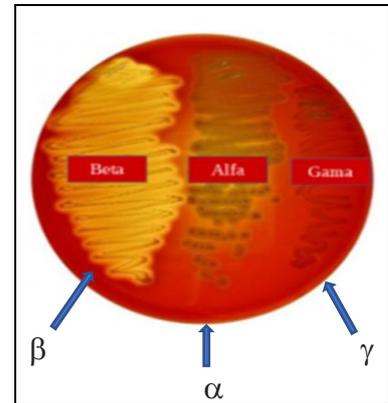
- Ágar Sangue

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*



- 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.*



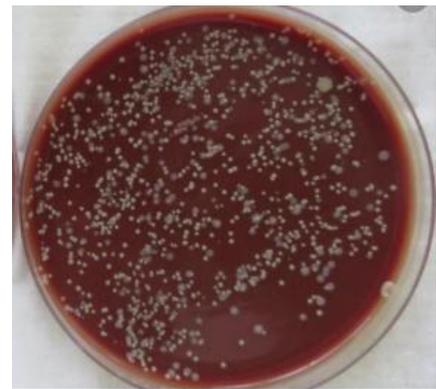
4. Meio Seletivo

Exemplos:

- 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

Exemplos:

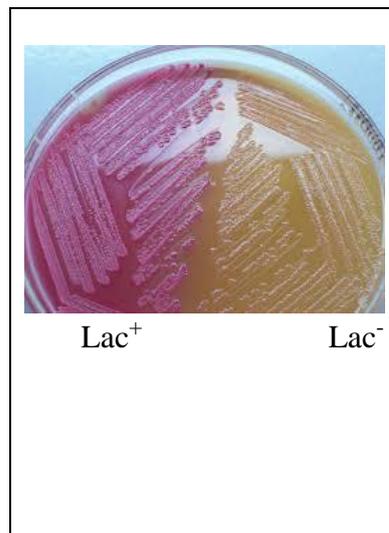
- Ágar MacConkey

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 crystal 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*)



- 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, ajuda na diferenciação das espécies de estafilococos.

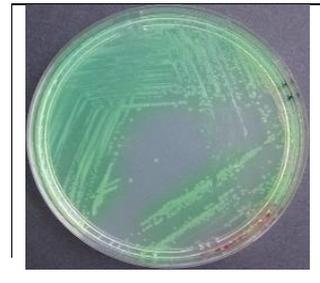
- Os estafilococos coagulase-positiva produzem colônias amarelas e um meio amarelo circundante, como:

- Os estafilococos coagulase-negativa produzem colônias vermelhas e nenhuma alteração na cor do indicador vermelho de fenol.



- 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*.



Ctrimide (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).

RESULTADOS, são suspeitos como positivos:

- ♣ 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*, *Providencia*, *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.

Que os conhecimentos adquiridos de bacteriologia lhe sejam muito uteis em sua vida!