

Quinta-feira, 14 de setembro de 2006.

Primeira aula prática.

**Meios de cultura, coloração de Gram e Microscopia**

**Utilizar o livro do Pelczan e/ou Tortora.**

**Meios de cultura:** é meio utilizado para cultivar o microrganismo.

Para esse cultivo são necessárias condições físicas e químicas específicas.

No laboratório utilizam-se condições fixas:

**Físicas:**

- pH neutro: 7,2 – 7,4
- pressão do meio deve ser adequada.
- temperatura para a maioria das bactérias é de 37 graus.
- atmosfera: algumas bactérias precisam de O<sub>2</sub>, outras são capnofílicas e necessitam de CO<sub>2</sub>. Bactérias anaeróbias estritas recebem uma mistura de gases que não contém oxigênio.

**Químicas:**

- **Bactérias quimioheterotróficas** são as que requerem fonte orgânica de carbono. Podem utilizar por exemplo a glicose. Também necessitam de P, S, N, K e NaCl.

**Exemplo de meio de cultura mínimo:**

Glicose – 5g

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2g

NaCl – 5g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1g

H<sub>2</sub>O destilada qsp – 1L

Alguns elementos entram no meio de cultura sem serem pesados, pois estão na própria constituição da água destilada (ela não é deionizada) ou junto com os outros sais. São os elementos traços: Cobre, Magnésio, Cobalto, Zinco.

**Meio quimicamente definido:** conhecem-se os elementos que o formam.

Bactérias **prototróficas** produzem os nutrientes de que precisam. Estas bactérias podem sofrer mutações e originar bactérias **auxotróficas** que necessitam receber alguns aminoácidos, por exemplo.

Alguns microrganismos são ditos **fastidiosos**: aqueles que necessitam de fatores de crescimento.

O meio também pode ser **quimicamente complexo**: é aquele que não se conhece a composição, por exemplo, ao se adicionar peptona ao meio não se sabe quais aminoácidos a formam. Esse meio pode existir também por contar com extratos (carne, levedura e soja) ou utilizar a caseína digerida. Um meio quimicamente complexo também é aquele enriquecido com sangue ou com soro. O laboratório trabalha com meios complexos.

**O Agar é utilizado como agente solidificante.**

Meios semi-sólidos são utilizados para medir a velocidade do agente microbiano.

Pode-se adicionar sangue à placa para verificar se a bactéria gera hemólise (se gerar a região ao redor da colônia vai ficar mais clara).

Algumas bactérias não se movem por causa dos lipídios do sangue, ou porque precisam do ferro, e por isso o sangue antes de ser adicionado ao meio é aquecido e forma agar chocolate (o meio de cultura adquire essa aparência).

Meios que contam com corantes (como a eosina e azul de metileno) são **meios seletivos**, por exemplo, para algumas gram-negativas como as enterobactérias.

O meio seletivo também pode ser obtido por adição de muito cloreto de sódio porque seleciona bactérias que sobrevivem em osmolaridade mais alta.

O meio seletivo também pode ser obtido pela adição de sais biliares.

Meios que recebem sacarose e lactose são ditos **diferenciais**: alguns grupos de bactérias vão ser positivos para sacarose e lactose e outros não. Agar sangue não é seletivo, mas é indicador.

**Meio de Stuart**: é utilizado para o transporte de secreções. Não estimula proliferação dos microrganismos, mas os conserva. Conta com meios tamponantes para evitar que os produtos ácidos do metabolismo dos microrganismos os matem.

**Meio caldo Tioglicolato** (reduz o oxigênio): no tubo de ensaio vê-se uma área verde acima onde o oxigênio foi reduzido e uma região amarelada embaixo onde o oxigênio é menos presente e não foi reduzido. Bactérias aeróbias crescem em cima, microaerófilas em baixo, e anaeróbias estritas mais embaixo ainda. Bactérias facultativas crescem em todo o tubo.

**Corantes básicos**: cristal violeta, fucsina básica e azul de metileno.

**Coloração simples** utiliza apenas um tipo de corante. Fornece a forma e o arranjo do microrganismo.

**Coloração diferencial**: por exemplo, o método de gram diferencia as gram-positivas e as gram-negativas. O método de ZichL-Neelsen diferencia as micobactérias.

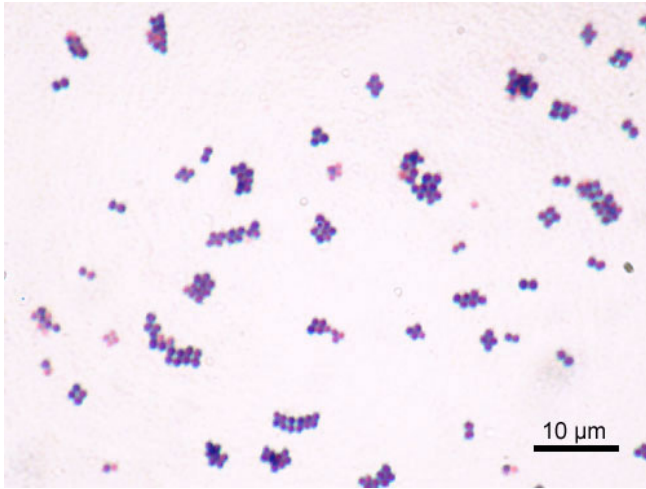
**Coloração positiva e coloração negativa**: a coloração negativa é feita pela tinta Nankim visto que determinadas estruturas dos microrganismos repelem a tinta.

## MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM

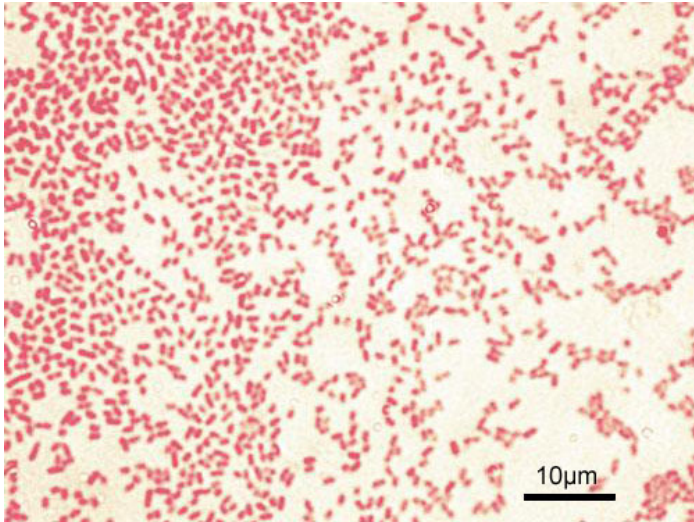
Pega-se uma lâmina e nela coloca-se solução fisiológica. A seguir a partir de uma cultura de bactérias que se encontra em uma Placa de Petri seleciona-se uma colônia bem distante das outras para que seja possível selecionar um tipo específico de bactéria. Essa retirada da bactéria da placa é feita através da Alça Bacteriológica que anteriormente deve ser devidamente esterilizada pelo bico de gás. O fragmento com bactérias é colocado na lâmina que contém a solução fisiológica e utilizando a alça tudo é espalhado. Em seqüência, espera-se a lâmina secar (esse procedimento pode ser acelerado colocando a lâmina a uma altura razoável do bico de gás e volta e meia a esfriando para evitar a lise das bactérias). Depois de seca a lâmina, inicia-se o processo de coloração diferencial de gram:

- 1) O **primeiro corante** utilizado é o **cristal violeta**: adiciona o corante à lâmina e o deixa agir durante um minuto. Após a lavagem tanto as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas ficam coradas.
- 2) O **segundo corante** utilizado é o **lugol** : adiciona o corante à lâmina o deixa agir durante um minuto: o iodo do lugol se condensa com o cristal e as bactérias ficam mais roxas após lavagem.
- 3) A seguir adiciona-se álcool-acetona **durante 10 segundos** (nesse caso o tempo é importantíssimo): bactérias gram-positivas ficam bem roxas e bactérias gram-negativas perdem a coloração. Isso ocorre porque o álcool dissolve a parede lipídica das bactérias gram-negativas (é importante lembrar que essas bactérias possuem externamente à parede celular uma membrana de composição semelhante a membrana celular). Como a parede das gram-negativas possui pouco PG, estas se coram menos.
- 4) Adiciona-se a **fucsina básica** durante 30 segundos que garante a coloração rosa às bactérias gram-negativas (as gram-positivas não ficam rosa porque possuem os seus grupamentos que poderiam se ligar a fucsina já ligados ao cristal violeta e ao lugol).

No microscópico as bactérias gram-positivas continuam roxas e as gram-negativas que estavam com os grupamentos livres coram-se em rosa (vermelho).



*Staphylococcus aureus*: gram-positiva.



*Pseudomonas aeruginosa*: gram-negativa.