

TREINO DE PRÁTICAS E HABILIDADES
Identificação das bactérias gram negativas NÃO fermentadoras
PROFA Alessandra Barone

Ao entrar no laboratório, certifique-se de estar de cabelo preso, jaleco fechado, sapato fechado e EPI (luvas).

Guarde todo material no armário e limpe a bancada antes do início do trabalho

Provas Bioquímicas e Identificação de bactérias gram negativas não fermentadoras

As provas bioquímicas são complementares na etapa de identificação e diferenciação de bactérias Gram negativas (Enterobactérias e Não fermentadores).

Após o isolamento primário e identificação de bactérias Gram negativas, é essencial a realização das provas bioquímicas para a identificação do gênero e/ou espécie, e para isso, são realizadas provas em meios específicos para a identificação de características do metabolismo bacteriano, pela degradação de substratos incorporados ao meio. Para a correta interpretação desses testes, é importante conhecer o funcionamento bioquímico de cada prova empregada.

OBJETIVO: Identificação de bactérias gram negativas a partir da semeadura em meios de cultura específicos utilizados para provas de análise de perfil bioquímico bacteriano

PROCEDIMENTO:

Os alunos deverão realizar as seguintes provas:

Análise de meio de cultura em estudo

Bacterioscopia

Prova da oxidase

Prova bioquímica me meio TSI

Prova bioquímica em meio SIM

Prova bioquímica em meio citrato

Prova bioquímica em meio uréia

Material de trabalho: Placas de cultura isolada em meio ágar sangue e MacConkey semeadas com *Pseudomonas aeruginosa*

Após assepsia da bancada e uma vez em posse do material de trabalho, os alunos deverão ligar o bico de Bunsen para realização do trabalho a seguir:

1 - ANÁLISE DO MEIO DE CULTURA

Meio MacConkey: Colônias **lactose negativas** .Pode haver odor típico de frutas. Notar pigmentação azulada no inóculo original. (Piocianina)

Ágar sangue: Analisar a presença de colônias beta hemolíticas

2 - BACTERIOSCOPIA

Cultura em placa

- Preparar a mesa para a realização da técnica mantendo na proximidade a placa de cultura bacteriana a ser analisada
- Flambar rapidamente uma lâmina de microscopia limpa, nos dois lados, "cortando" lentamente a chama do bico de Bunsen;
- Pingar uma gota de solução salina estéril na lâmina no cone de esterilização.
- Com a mão direita flambar a alça de platina até o rubor. Com a mão esquerda abrir a placa no cone de isolamento e esfriar a alça na placa de cultura em local sem colônias.
- Pegar uma amostra de colônia com alça e fechar a placa de cultura
- Espalhar a amostra em lâmina de forma de fique uniforme
- Deixar secar ao lado do bico de Bunsen naturalmente

Técnica

- Cobrir com cristal violeta e deixar agir por 1 minuto;
- Lavar com água tomando cuidado pra que o jato não incida diretamente no material a ser analisado.
- Cobrir com solução de lugol por 1 minuto;
- Lavar
- Descorar com álcool acetona - 5 segundos;
- Lavar com água;
- Corar com fucsina fenicada por 45 segundos;
- Lavar com água, secar e observar em objetiva de 100 x com óleo de imersão.

Resultado

- Bactéria Gram positiva - roxo escuro
- Bactéria Gram negativa - avermelhadas (rosada)

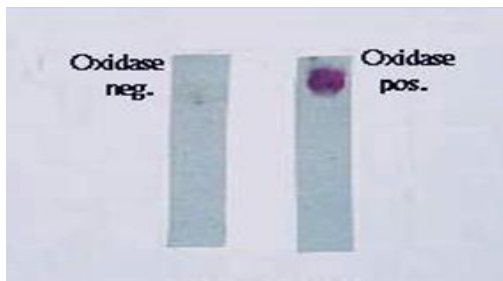
3- PROVA DA OXIDASE

- Em chama de bico de bunsen, pegar uma amostra da bactéria em estudo e aplicar as colônias em um papel de filtro e adicionar o reativo dimetil-*p*-fenilenodiamina.
- *P*-fenilenodiamina é oxidado pela enzima adquirindo cor roxa

Resultado :

Pseudomonas (+)

Enterobactérias (-)



4 - CULTURA EM MEIO TSI

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, lentamente até a base, ao retirar a agulha fazer a estria na região inclinada;
- Incubar a 35°C por 18-24 horas;
- Realizar a leitura visual da fermentação dos açúcares, formação de gás e sulfeto.

Resultado:

Vermelho = Ausência de fermentação dos açúcares (cor original do meio)

Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares).

Presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado.

Ápice Vermelho e base amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos).

H₂S positivo = presença de precipitado negro.

5- CULTURA EM MEIO SIM - Motilidade Indol Sulfeto

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, lentamente até a base;
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial do inóculo;
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.
- Realizar a leitura da motilidade e do H₂S após 24 horas.
- Em seguida adicionar 5 gotas do reagente de Kovacs pela parede do tubo, no meio contendo o crescimento bacteriano. Agitar o tubo suavemente e proceder a leitura do indol.

Resultado:

Motilidade positiva = microrganismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez.

Motilidade negativa = bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido.

H₂S positivo = ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra.

H₂S negativo = linha ao longo da inoculação inalterada.

Indol for negativo (Figura 11) = aparecerá um anel amarelo.

Indol positivo (Figura 12) = aparecerá um anel vermelho.

6 - CITRATO:

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, fazendo uma estria na região inclinada (não furar a base);
- Incubar a 35°C por 18-24 horas;
- Realizar a leitura visual da mudança ou não de coloração do meio.

Resultado:

Cor original do meio: Verde

Positivo = Mudança de coloração do meio de verde para azul;

Negativo = Ausência na mudança de coloração do meio.

7- URÉIA

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, lentamente até a base;
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial do inoculo;
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

Resultado:

Cor original do meio : amarelo

Positivo: mudança de cor para rosa

Negativo: ausência de coloração do meio

FINALIZAÇÃO:

Os meios deverão ser identificados após incubação de 24 horas e o resultados das provas bioquímicas comparados ao perfil bacteriano.

Pseudomonas aeruginosa

- Meio TSI: ausência de fermentação dos açúcares: meio vermelho
- Utilização do citrato como fonte de carbono
- Mobilidade positiva
- Reduzem nitrato a nitrito
- Indol negativo
- H₂S negativo
- Oxidam glicose (citocromo oxidase positivo)
- Urease +/-