

Técnicas de Isolamento de Bactérias em Culturas Puras.

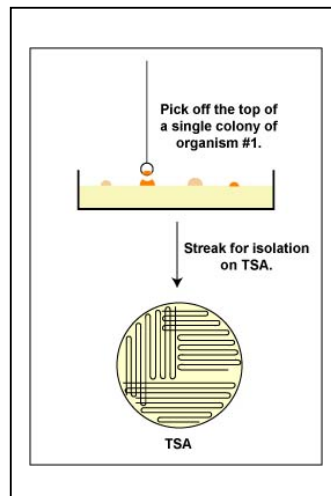
Introdução

Na aula anterior procederam à sementeira e inoculação de meios agar nutriente e caldo nutriente, com microrganismos do corpo humano e do meio ambiente. Os Objectivos desta aula consistem de: (1) isolamento em cultura pura a partir das culturas mistas que foram obtidas nessa aula, em meio sólido, o agar nutriente, através da técnica de sementeira por esgotamento (streak plate); (2) Análise do crescimento em meio líquido, caldo nutriente, e correlação com as necessidades de oxigénio dos microrganismos presentes.

Material e Métodos

- caixas de petri com agar nutriente e colónias em desenvolvimento
- tubos de caldo nutriente com crescimento
- ansas de inoculação
- caixas de petri com agar nutriente estéril
- lamparinas de álcool ou bicos de Bunsen

1. Observe o desenvolvimento de colónias de microrganismos no meio agar nutriente. Registe a forma, tamanho, cor, elevação, bordos, das colónias desenvolvidas. Quantos tipos distintos de colónias se desenvolveram? Qual a proveniência dessas colónias?
2. Observe o crescimento de microrganismos no meio caldo nutriente. Registe a formação de (a) turvação homogénea; (b) sedimento; (c) película superficial. Classifique os microrganismos relativamente às necessidades de oxigénio.
3. Selecciona 2 a 3 tipos distintos de colónias desenvolvidas no agar nutriente. Anote as características morfológicas das colónias seleccionadas.



4. Com uma ansa previamente esterilizada à chama e arrefecida, toque numa das colónias escolhidas e semeie em placa de agar nutriente, seguindo os movimentos exemplificados na figura e fotocópia anexa, relativas a sementeira por esgotamento. Esterilize a ansa antes de cada arrastamento. Anote na placa de petri de onde provem o inóculo e a data. Repita o mesmo procedimento para os outros tipos de colónias seleccionadas.

5. Após as sementeiras inverta as caixas e incube a 30-37°C, 48h.

Cuidado para não contaminar os meios. Observe as condições de asépsia. Abra a tampa das caixas apenas o necessário para as inoculações. Trabalhe sempre junto à chama da sua lamparina.

Após incubação os alunos examinarão as placas e verificarão se obtiveram culturas puras. Para o sucesso desta experiência é necessário trabalhar com assépsia, ter cuidado na selecção das colónias, tocar com a ansa apenas numa colónia seleccionada, ter cuidado com os movimentos da ansa em cima do agar de modo a obter um bom isolamento das novas colónias

Supondo que a sua experiência foi bem sucedida e que possui em cada caixa de meio apenas um tipo de colónia, irão proceder da seguinte forma:

1. Efectuar um esfregaço e corá-lo de acordo com a metodologia da coloração de Gram (refira-se ao protocolo sobre esta coloração).
2. proceder ao **teste da Catalase**: Coloque uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% numa lâmina de vidro limpa; retire um pouco da sua colónia com uma pipeta Pasteur previamente esterilizada à chama; verifique se se libertam bolhinhas (reacção positiva) ou não (reacção negativa).



3. proceder ao **teste da Oxidase**, utilizando slides DIFCO "Dryslide Oxidase" ou bastonetes da Oxidase da OXOID. As bactérias oxidase positivas possuem a enzima citocromo c oxidase, a qual permite a oxidação de determinados compostos aminados.

Reporte-se á bibliografia indicada para interpretação dos resultados. Com os dados da coloração de Gram, oxidase e catalase talvez já consiga saber qual o género (géneros) da sua bactéria desconhecida.

Bibliografia:

Seeley, HW Jr, Vandermark, PJ, Lee, JJ (1991). Chapter 9, 38