

AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE LINHAGEM BACTERIANA ATCC DE UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Dara Rafaela Miranda*

Katia Tais Rossi*

Evandro Francisco de Souza*

Jane Mary Lafayette Neves Gelinski**

Resumo

Este trabalho apresenta as técnicas que foram realizadas para isolar, identificar uma cultura bacteriana liofilizada (ATCC). Vários testes foram realizados para melhor entendimento e compreensão e tentar definir o gênero e a espécie da bactéria. Inicialmente, a ativação dessa bactéria precisou ser realizada em um caldo nutritivo, após a ativação, testes básicos como coloração de Gram e Catalase para identificar entre os grupos sugeridos pela supervisora do trabalho.

O objetivo principal foi a identificação correta do microrganismo para determinar um uso adequado na categoria de alimentos sempre realizando testes em duplicata para que não houvessem erros de contaminação e interpretação, pois deve-se seguir um padrão de controle na pesquisa científica, tecnológica.

Os primeiros testes dão vias específicas a serem seguidas. Assim, foram utilizados meios de cultura e condições de incubação adequadas, com o objetivo de favorecer o crescimento dos microrganismos de interesse.

Posteriormente, foram realizados testes como produção de gás em tubo, reação de Gram, catalase, heólise em ágar sangue e, perfil de sensibilidade a antimicrobianos, não para identificar, mas para avaliar o grau de resistência e possibilidade tecnológica de uso do microorganismo. Esta pesquisa foi realizada visando ao aprimoramento e desenvolvimentos de técnicas laboratoriais em microbiologia durante atividades de ensino em laboratório, sendo importante para o crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Uma cultura foi entregue para esta pesquisa apenas com a informação de que se tratava de uma cultura do gênero *Streptococcus* ou do gênero *Staphylococcus*. O objetivo foi aplicar técnicas básicas em microbiologia para se chegar a uma conclusão com base nos resultados obtidos sobre qual dos microorganismos se tratava a cultura liofilizada recebida.

Esse estudo, desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da do Núcleo Biotecnológico da Unoesc, Videira, foi parte integrante do componente curricular Microbiologia II, do Curso de Biotecnologia industrial.

Foi utilizado o caldo e o ágar infuso de cérebro e coração estéreis-BHI para crescimento de linhagem liofilizada (ATCC) e pertencente ao laboratório de microbiologia. Assim, os caldos e os ágaros com a cultura foram incubados a temperatura de 37, 25, 28 e 44°C/24h. Com as culturas que tiveram crescimento abundante foram realizados repiques em ágar sangue pela técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Após isso, foram feitos repiques em agar Nutriente para conservar a bactéria viável e utilizá-la nos teste seguintes.

Após, também fez-se a semeadura da bactéria em meio Agar Baird-Parker o qual permaneceu por 24 horas na temperatura de 37°C, no dia seguinte foi verificada a morfologia das colônias por análise microscópica.

A determinação do arranjo morfológico dos isolados foi realizada com base na sua característica morfológica por microscopia óptica de luz e por coloração de Gram.

A prova bioquímica Catalase consiste de passar com uma alça de Köhler uma colônia da bactéria a ser analisada sobre uma lamina de vidro pingar

sobre a mesma uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, observando-se ou não a formação de bolhas (oxigênio).

Para as bactérias do gênero *Staphylococcus*, geralmente a prova é positiva, ocorrendo a formação de bolhas. Enquanto para os *Streptococcus*, a prova é negativa.

Primeiramente foram preparados dois tubos, um contendo o caldo nutriente com NaCl a 6,5 % e outro com duas ou três colônias de bactéria, em seguida homogeneizadas em agitador tipor vortex automático, e colocado para crescimento 24 horas/37 °C. No dia seguinte observou-se a turvação ou não do meio, indicador de crescimento, portanto, a prova é positiva; não havendo turvação do meio a prova bioquímica é negativa. Beta-Hemolysis: primeiramente foi realizada uma semeadura em Agar sangue pela técnica de esgotamento para verificar qual tipo de hemólise a bactéria poderia produzir. Logo após foi deixado a 37°C/24h. Para a cultura ter sido reativada, foi semeada também em meio Agar Baird-Parker e a 37 C°/24h. Quanto ao teste de sensibilidade da linhagem a antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), a metodologia de Kirby e Bauer (1966) para antibiograma é a mais utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua praticidade, baixo custo e fidedignidade de seus resultados (EUCAST, 2016).

No Brasil, a ANVISA padroniza a utilização do CLSI para os laboratórios. Para a realização dessa técnica prepararam-se placas de Petri (15 x150 mm) contendo meio de cultivo Agar Muller Hinton-MH. Em seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana do isolado selecionado em uma concentração 0,5 de MacFarland (1x10E8 UFC/mL). E, após semeadura com swab na placa de Agar MH, fez-se, com auxílio de duas pinças flambadas e resfriada, a deposição dos antibióticos (Laborclin, São Paulo).

No total foram 12 discos depositados, sobre a superfície do Agar MH: tetraciclina (30µg) eritromicina (15 µg) cloranfenicol (30 µg), penicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg) rifampicina (5 µg), oxacilina (1µg), vancomicina (10 µg) clindamicina (2 µg), cefepime (30 µg) e sulfazotrim (25µg). A incubação foi realizada a 37 °C/24h.

Os resultados foram avaliados de acordo com o padrão da CLSI (2016). As colônias apresentaram de coloração negra sem halo em Agar Baird-Parker. A morfologia foi cocos com arranjo em cadeia e Gram positiva. As colônias foram catalase negativa. Não houve crescimento em caldo com 6,5 % de NaCl . O microorganismos não cresceu à temperatura de 10°C, teve pouco crescimento a 25°C e a 28°C, mas multiplicou-se bem a 37°C e a 44°C. Foi sensível a todos os antibióticos utilizados neste estudo e foi negativo para β -hemolysis. Pelo conjunto de resultados, a linhagem foi considerada Streptococcus Thermophilus. Isto foi confirmado durante a apresentação final da pesquisa pela supervisora da atividade do componente curricular Microbiologia II.

As técnicas de isolamento e identificação bacteriana são úteis para identificação, mas nem sempre são definitivas. Portanto, as análises realizadas permitiram chegar a uma provável identificação, mas se o grupo de alunos aqui envolvido não tivesse recebido uma indicação para o encaminhamento das análises a partir de dois gêneros bacterianos, não teria sido possível chegar a definição de espécie, mas só do Gênero. Seriam, portanto, necessárias outras análises bioquímicas e moleculares para uma identificação segura.

* Graduandos em Biotecnologia Industrial

**Professora orientadora, componente curricular Microbiologia II, curso de Biotecnologia Industrial - Unoesc campus de Videira.

Emails: kati.thaisrossi@hotmail.com; darafaelamiranda@gmail.com;

souzaevandro2008@hotmail.com.