

Isolamento e Identificação de BACTÉRIAS

Procedimentos
Laboratoriais
Básicos



Victor M. Balcão
Marta M. D. C. Vila
Lucas M. R. Rodrigues
Fernando S. Del Fiol
Alessandro M. Santos

André R. Marra
Bruna C. A. Nogueira
Júlio C. Mescoloto
Renata L. S. Silva



ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
procedimentos laboratoriais básicos

Reitor e Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa (PROPG): José Martins de Oliveira Jr.

Pró-Reitor Administrativo, de Inovação e de Internacionalização (PROADIN): Rogério Augusto Profeta

Pró-Reitor de Graduação, Assuntos Estudantis e Extensão (PROGRADE): Fernando de Sá Del Fiol

Direção editorial: Rafael Ângelo Bunhi Pinto

Editores assistentes: Silmara Pereira da Silva Martins; Vilma Franzoni

Conselho editorial

Daniel Bertoli Gonçalves

José Martins de Oliveira Júnior

José Renato Poli

Luiz Paulo Ribeiro

Marcelo Augusto Scudeler

Marco Vinicius Chaud

Maria Ogécia Drigo

Rafael Augusto Moreira

Vidal Dias da Mota Junior

Editora da Universidade de Sorocaba (Eduniso)

Biblioteca "Aluísio de Almeida"

Rodovia Raposo Tavares KM 92,5

18023-000 – Jardim Novo Eldorado

Sorocaba | SP | Brasil

Fone: (15) 21017018

E-mail: eduniso@uniso.br

Site: <https://editora.uniso.br>

Victor M. C. F. Balcão, Marta M. D. C. Vila, Lucas M. R.
Rodrigues, Fernando S. Del Fiol, Alessandro M. Santos,
André R. Marra, Bruna C. A. Nogueira, Júlio C. Mescoloto,
Renata L. S. Silva

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS **procedimentos laboratoriais básicos**

Eduniso
Sorocaba/SP
2026

©2026 Isolamento e identificação de bactérias:
procedimentos laboratoriais básicos.

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida,
desde que citada a fonte. Todos os direitos desta edição estão
reservados aos autores.



4.0 internacional

Créditos

Capa: Lucas Navarro

Ilustrações: Alessandro Santos; Lucas Navarro e Victor Balcão

Normalização: Vilma Franzoni

Diagramação: Silmara Pereira da Silva Martins

Ficha Catalográfica

Isolamento e identificação de bactérias : procedimentos laboratoriais
básicos / Balcão, Victor M.; Vila, Marta M. D. C.; Rodrigues, Lucas M.
R. *et al.* -- Sorocaba, SP : Eduniso, 2026.
227p. ; il.

Publicação digital (e-book) em formato PDF
e-ISBN: 978-65-89550-34-1

DOI: <https://doi.org/10.22482/eduniso.71>

1. Microbiologia. 2. Vírus bacterianos. 3. Células bacterianas.
4. Laboratórios de microbiologia – Segurança. I. Balcão, Victor M, II.
Vila, Marta M. D. C., III. Rodrigues, Lucas M. R.

Elaborado por Vilma Franzoni – CRB-8/4485

Victor M. C. F. Balcão, Marta M. D. C. Vila, Lucas M. R.
Rodrigues, Fernando S. Del Fiol, Alessandro M. Santos,
André R. Marra, Bruna C. A. Nogueira, Júlio C. Mescoloto,
Renata L. S. Silva

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS **procedimentos laboratoriais básicos**

Nada é isolável. Toda a coisa isolada
deixa de existir.

Uma borboleta suga um goivo: é uma
borboleta mais o suco de goivo; é um
goivo menos um apetite de borboleta!
(Charles Hoy Fort)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
Atm	Atmosfera
°C	Graus Centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
g	Aceleração da Gravidade ($m s^{-2}$)
L	Litro
λ	Comprimento de Onda
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
MTA-TSB	Molten Top Agar - TSB
OD	Densidade Óptica
PES	Poliétersulfona
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
RNA	Ácido Riblonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por Minuto
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UNISO	Universidade de Sorocaba
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VBlab	Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso

SUMÁRIO

PREFÁCIO	11
APRESENTAÇÃO	16
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Organização das células bacterianas: uma visão geral.	24
1.2 O envelope celular	25
1.3 Estruturas citoplasmáticas	30
1.4 Estruturas externas	31
1.5 Permeabilidade da membrana externa.....	32
1.6 Mecanismo da coloração de Gram.....	32
1.7 Componentes externos à parede celular	35
1.8 Motilidade bacteriana	36
2 REGRAS DE SEGURANÇA NUM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	38
2.1 Limpeza de materiais de laboratório	42
2.2 Descontaminação do local de trabalho	43
2.3 Descontaminação de cabines de segurança biológica.	44

2.4 Lavagem e/ou descontaminação das mãos	44
2.5 Desinfecção e esterilização pelo calor em autoclave ...	44
2.6 Manipulação de mostras biológicas e ambientais	45
2.7 Descarte	46
3 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E TAMPÕES	48
3.1 Meio sólido <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA)	48
3.2 Caldo <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	49
3.3 Caldo <i>Tryptic Soy Broth Double Concentration</i> (TSB 2x)	49
3.4 Tampão <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) concentrado [10x] e tampão PBS [1x]	49
3.5 Solução salina 0,9% (m/m)	50
4 TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO	51
4.1 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras sólidas: solo	54
4.2 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras líquidas: esgoto e rio	63

4.3	Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras sólidas: tecidos vegetais	70
4.4	Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos líquidos: ovo e leite	79
4.5	Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos sólidos	88
4.6	Curva de crescimento bacteriano	97
5	TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: PROTOCOLOS PARA IDENTIFICAÇÃO	102
5.1	Caracterização fenotípica	104
5.2	Caracterização bioquímica	106
5.3	Caracterização genômica	120
6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	123
6.1	Coleta e preparação das amostras	124
6.2	Meios de cultura mais utilizados	125
6.3	Confirmação preliminar da presença de bactéria fitopatogênica, isolamento e obtenção de colônias puras	126


6.4 Testes de patogenicidade: reação de hipersensibilidade e inoculação em hospedeiro	132
6.5 Identificação preliminar	134
6.6 Chave para identificação preliminar de bactérias fitopatogênicas.....	140
6.7 Identificação molecular de bactérias fitopatogênicas	142
6.8 Identificação de bacterioses não fastidiosas do cafeeiro	146
6.9 Identificação de bacteriose do maracujazeiro	150
7 TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	156
BIOPORQUÊS.....	160
BIOGLOSSÁRIO	162
REFERÊNCIAS	212
SOBRE OS AUTORES.....	221



PREFÁCIO


A microbiologia é uma ciência fundamental que nos permite compreender o mundo invisível ao olho nu, revelando a complexidade e a diversidade dos microrganismos que habitam nosso planeta. Entre esses seres microscópicos, as bactérias desempenham papéis cruciais na manutenção da vida, influenciando processos ambientais, industriais, agrícolas e de saúde pública.

Esta obra foi elaborada com o objetivo de oferecer uma abordagem abrangente e prática sobre o estudo das bactérias, desde a organização, estrutura, classificação, manipulação, isolamento e identificação, voltada especialmente para estudantes de pós-graduação, uma vez que o seu nascimento ocorreu das rotinas utilizadas pelo grupo de pesquisadores e alunos de Pós-graduação do Laboratório de Vírus Bacterianos da Universidade de Sorocaba (VBlab).



Na primeira parte, os autores apresentam uma visão geral da organização das células bacterianas. Compreender a estrutura celular é essencial para entender suas funções e mecanismos de sobrevivência. Discute-se detalhadamente o envelope celular, incluindo a membrana plasmática e a parede bacteriana, além das estruturas citoplasmáticas que sustentam as atividades metabólicas dessas células. A permeabilidade da membrana externa é abordada com ênfase na sua importância na resistência aos agentes antimicrobianos e na troca de substâncias com o ambiente. O mecanismo de coloração de Gram é explicado como uma ferramenta fundamental na classificação bacteriana, facilitando a diferenciação entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Ainda nesta seção, exploram-se os componentes externos à parede celular, como os flagelos e pili, essenciais para motilidade e adesão às superfícies.

A segunda parte desta obra, dedica-se às regras de segurança em laboratórios de microbiologia. A manipulação segura de materiais biológicos é imprescindível para proteger os profissionais e evitar contaminações cruzadas. São detalhadas as práticas recomendadas para limpeza de



materiais, descontaminação do ambiente de trabalho e uso adequado de cabines de segurança biológica. Destaca-se também a importância da higiene pessoal através da lavagem correta das mãos, além dos procedimentos para desinfecção e esterilização por calor em autoclaves. Protocolos específicos para o manejo de amostras biológicas e ambientais são apresentados com rigor técnico, assim como orientações para o descarte seguro de resíduos.


Na terceira seção, aborda-se a preparação de meios de cultura essenciais ao cultivo bacteriano. Desde meios sólidos como o Tryptic Soy Agar (TSA) até meios líquidos como o caldo Tryptic Soy Broth (TSB), cada procedimento é descrito com detalhes práticos para garantir resultados confiáveis. Os autores discutem também informações sobre tampões buffer salino e soluções salinas utilizadas na manipulação diária das bactérias. A preparação de congelados de bactérias é explicada como uma técnica indispensável para armazenamento a longo prazo, preservando cepas importantes para pesquisa ou diagnóstico.



Na quarta parte encontramos protocolos específicos para o isolamento bacteriano a partir de diferentes tipos de amostras: sólidas (solo, tecidos vegetais), líquidas (esgoto, rio) e alimentos (ovos, leite). Cada protocolo foi elaborado considerando as particularidades dessas amostras, visando otimizar a recuperação dos microrganismos presentes. Além disso, discute-se a curva de crescimento bacteriano como ferramenta para estudar as fases do ciclo populacional sob condições controladas.

Na quinta seção, os autores trazem os métodos utilizados na identificação bacteriana. A caracterização fenotípica inclui testes morfológicos e culturais básicos; a bioquímica fornece informações sobre as reações metabólicas específicas; enquanto as técnicas genômicas representam avanços recentes que possibilitam uma identificação mais precisa e rápida das espécies bacterianas.

Por fim, são apresentadas as chaves de identificação bacteriana como instrumentos práticos que auxiliam no reconhecimento sistemático dos microrganismos estudados nesta obra. Essas ferramentas são essenciais tanto para



estudantes quanto para profissionais atuantes em laboratórios clínicos, ambientais ou industriais.

Que esta obra seja uma bússola para aqueles que se aventuram pelo fascinante universo da microbiologia bacteriana. Que ela sirva não apenas como um guia técnico, mas como uma fonte de inspiração para novas pesquisas, descobertas e avanços científicos. A cada página, espera-se que o leitor compreenda não apenas a complexidade dos microrganismos, mas também a imensa contribuição que eles oferecem à vida em nosso planeta. Que este conhecimento seja um estímulo para a curiosidade, para o pensamento crítico e para o compromisso com a ciência, permitindo que futuros pesquisadores, professores e profissionais fortaleçam o papel fundamental da microbiologia na construção de um mundo mais saudável, sustentável e inovador.

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Júnior
Reitor e Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Sorocaba (Uniso)



APRESENTAÇÃO

Este livro foi concebido como um guia técnico e conceitual para estudantes de pós-graduação do Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab) da Universidade de Sorocaba (Uniso), com o objetivo de fornecer um ponto de partida sólido para a exploração da diversidade bacteriana presente em ambientes naturais, com ênfase no isolamento e identificação de linhagens bacterianas que possam, futuramente, atuar como hospedeiras para a prospecção de bacteriófagos.

A motivação para a elaboração desta obra surgiu da necessidade prática de padronizar e consolidar os procedimentos laboratoriais envolvidos na obtenção de isolados bacterianos viáveis e bem caracterizados, a partir de amostras ambientais e de alimentos, líquidas e sólidas, como solos, sedimentos, águas superficiais e resíduos orgânicos, matrizes alimentares sólidas e líquidas como leite e ovo (clara e gema). Reconhecendo que o sucesso no isolamento



de bacteriófagos está intrinsecamente ligado à diversidade e à qualidade dos hospedeiros bacterianos disponíveis, este livro propõe uma abordagem cuidadosa e sistemática para o trabalho inicial com essas bactérias.

Cada protocolo apresentado foi selecionado com base em sua eficácia, reprodutibilidade e aplicabilidade em um ambiente acadêmico-laboratorial. Foram incluídas, além de técnicas clássicas de cultivo e isolamento, metodologias atualizadas que contemplam os desafios da cultivabilidade bacteriana, como o uso de meios seletivos e condições de cultivo que simulam o ambiente original da amostra. Complementarmente, o livro aborda estratégias básicas de caracterização fenotípica e genotípica, incluindo a amplificação do gene 16S rRNA, permitindo a identificação preliminar dos isolados obtidos.

Este material foi elaborado com foco didático, visando apoiar o desenvolvimento técnico e o pensamento crítico dos alunos em formação. Ao seguir os protocolos aqui descritos, os estudantes não apenas aprenderão a dominar os fundamentos do cultivo bacteriano, mas também contribuirão para a construção de um banco de cepas



hospedeiras com potencial para aplicações futuras em estudos de ecologia viral, terapias fágicas, e desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

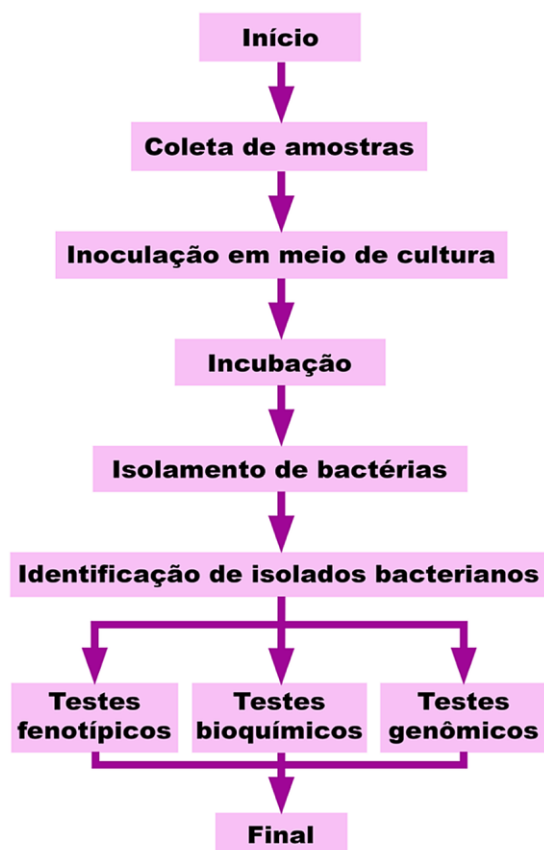
Mais do que um manual de procedimentos, este livro convida à descoberta: cada colônia isolada, cada cepa identificada, representa a possibilidade de um novo fago a ser encontrado — e, com ele, novas perguntas, aplicações e caminhos científicos a serem explorados.

Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Quero iniciar pesquisa com isolamento de bactérias para posteriormente servirem de hospedeiras no isolamento de bacteriófagos, por onde começo?

Para responder a esta pergunta, apresenta-se abaixo (Esquema 1), um esquema com uma sequência lógica de atividades a serem feitas em pesquisa com isolados bacterianos.

Esquema 1 — Sequência lógica de procedimentos para trabalhos de pesquisa com isolamento e identificação de bactérias





Where shall I begin, please your majesty? He asked. Begin at the beginning the King said, gravely, and go on till you come to the end: then stop!

Dialogue between the White Rabbit and the King of Hearts.

Alice's Adventures in Wonderland, Ch. 10
Sir Charles Lutwidge Dodgson (Lewis Carroll)



1 INTRODUÇÃO

As bactérias são os mais simples organismos encontrados na maioria dos ambientes naturais. Elas são células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados, alcançando dimensões da ordem de micrômetros no eixo linear.

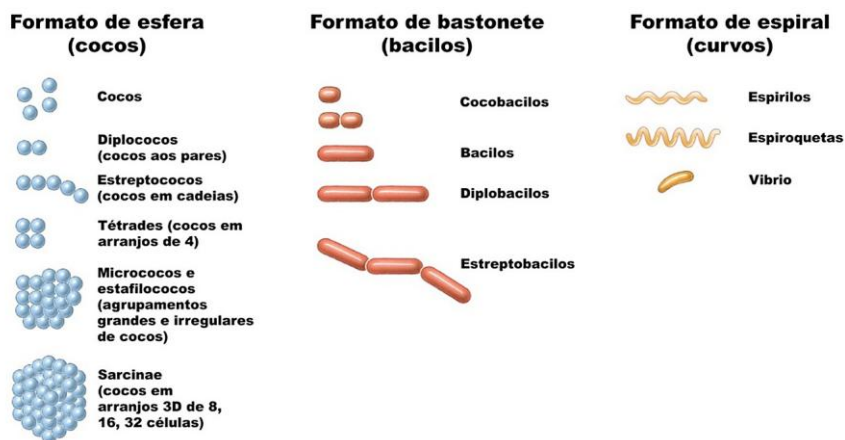
As bactérias são microrganismos unicelulares com uma estrutura celular complexa e altamente organizada. Apesar de seu tamanho microscópico, as bactérias exibem notável adaptabilidade e funcionalidade devido aos componentes especializados dentro e ao redor de suas células. Compreender a organização das células bacterianas é essencial para compreender sua fisiologia, ecologia e papel na saúde e na doença.

As bactérias são pequenas e podem multiplicar-se com rapidez, simplesmente se dividindo por fissão binária. Quando o alimento é farto, "a sobrevivência dos mais fortes" em geral significa a sobrevivência daqueles que se dividem

mais rapidamente. Em condições adequadas, uma simples célula procariótica pode dividir-se a cada 20 min, dando origem a 5 bilhões de células em pouco menos de 12 h.

A Figura 1 apresenta uma representação esquemática das formas bacterianas mais comuns.

Figura 1 — Formas bacterianas mais comuns



Fonte: imagem gerada parcialmente com recurso de Inteligência Artificial Generativa (chatGPT-4o)

As bactérias medem geralmente entre 0,5 e 1 um. A superfície de absorção é relativamente alta nas bactérias e tem sido associada à capacidade reprodutiva (uma divisão a cada 20 min).

As bactérias com formato esférico são os cocos, em formato de bastão são os bacilos, e as helicoidais ou



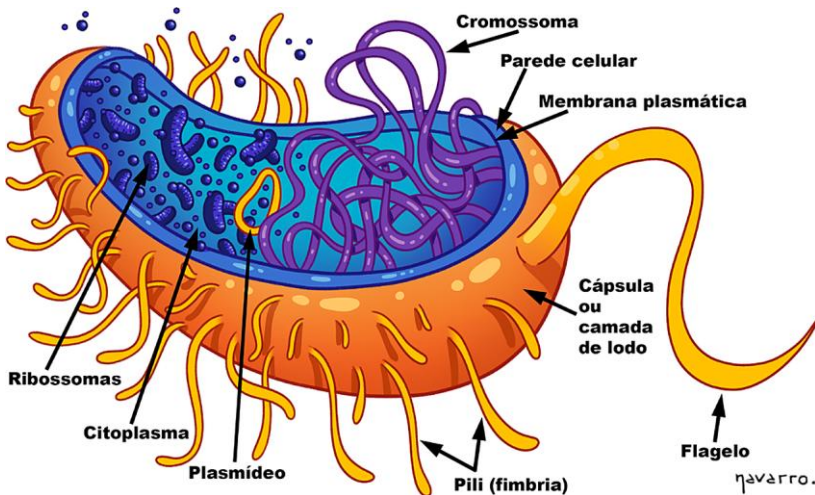
espiraladas são os espirilos e espiroquetas. Os bacilos podem ter porções terminais quadradas, arredondadas ou pontiagudas.

As bactérias podem ser classificadas, além da forma, quanto ao arranjo: (i) cocos, que são células esféricas que quando agrupadas aos pares recebem o nome de diplococos; (ii) quando o agrupamento constitui uma cadeia linear de cocos estes são denominados estreptococos; (iii) cocos em grupos irregulares, lembrando cachos de uva, recebem a designação de estafilococos; (iv) bacilos são células cilíndricas, em forma de bastonetes, apresentando-se geralmente como células isoladas, porém, ocasionalmente, podem observar-se bacilos aos pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos); (v) formas intermediárias entre cocos e bacilos são chamadas de cocobacilos; (vi) espirilos são células espiraladas e geralmente apresentam-se como células isoladas; (vii) algumas bactérias são pleomórficas e podem mudar a sua forma conforme as colônias envelhecem; (viii) os arranjos são as categorias de agrupamento observadas nas colônias.


1.1 Organização das células bacterianas: uma visão geral

Todas as células bacterianas compartilham um layout organizacional comum, tipicamente dividido em três componentes principais (Figura 2). Na maioria das espécies, a proteção da célula é feita por uma camada extremamente resistente, a parede celular, havendo imediatamente abaixo uma membrana citoplasmática que delimita um único compartimento contendo DNA, RNA, proteínas e pequenas moléculas.

Figura 2 — Representação esquemática geral da estrutura de uma célula bacteriana



Fonte: elaborada por Lucas Navarro




Esses três componentes principais são: (i) envelope celular (composto por três camadas), (ii) citoplasma (matriz interna da célula), e (iii) estruturas externas (apêndices e camadas protetoras que se estendem além da célula). Veremos de seguida cada um deles em maior detalhe.

1.2 O envelope celular

O envelope da célula bacteriana é uma estrutura multicamadas que fornece proteção, mantém a forma da célula e medeia a sua interação com o ambiente que a rodeia. Ele inclui: Membrana Plasmática, Parede Celular, e Camadas externas à parede celular.

A **Membrana Plasmática** é uma estrutura essencial para todos os organismos vivos, incluindo bactérias. Algumas bactérias também podem possuir sistemas de membrana interna, que envolve o citoplasma, atua como uma barreira seletivamente permeável e participa de interações ambientais por meio de receptores, sistemas de transporte e processos metabólicos.

A membrana plasmática segue o modelo de mosaico fluido, compreendendo uma bicamada lipídica com




proteínas flutuantes. Os lipídeos são anfipáticos, isto é, possuem extremidades hidrofílicas (polares) que interagem com a água e caudas hidrofóbicas (apolares) que são insolúveis em água.

As proteínas da membrana são de dois tipos, proteínas periféricas (fracamente aderidas e facilmente removíveis) e proteínas transmembranares (incorporadas e frequentemente anfipáticas, com papéis funcionais vitais, às vezes formando microdomínios).


Os níveis de saturação dos lipídios da membrana bacteriana refletem as condições ambientais, especialmente a temperatura. Embora as membranas bacterianas não possuam esteróis, elas contêm hopanóides (por exemplo, bacteriohopanetetrol), moléculas semelhantes a esteróis que estabilizam a membrana.

A **Parede Celular** encontra-se localizada fora da membrana plasmática, sendo composta principalmente de peptidoglicano (mureína) e desempenhando diversas funções: (i) mantém a forma da bactéria, (ii) oferece proteção contra lise osmótica e substâncias tóxicas, e (iii) pode contribuir para a patogenicidade.



O peptidoglicano é um polímero em forma de malha com subunidades idênticas que formam longas cadeias de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). Essas cadeias têm formato helicoidal e são reticuladas por peptídeos para maior resistência estrutural, formando redes interconectadas. As paredes celulares de bactérias Gram-Positivo e Gram-Negativo apresentam diferenças significativas entre elas.

Nas **bactérias Gram-Positivo**, a parede celular possui uma camada espessa de peptidoglicano, contém ácidos teicóicos (com carga negativa) que mantêm a integridade do envelope, protegem contra o estresse ambiental e podem ligar-se às células hospedeiras. Algumas bactérias Gram-positivo podem ter camadas de proteínas na superfície do peptidoglicano. O espaço periplásmico das bactérias Gram-positivo está localizado entre a membrana citoplasmática e a parede celular, é menor do que o das bactérias Gram-negativo e possui menos proteínas. As enzimas secretadas pelas bactérias Gram-positivo são designadas exoenzimas e ajudam na degradação de nutrientes grandes.

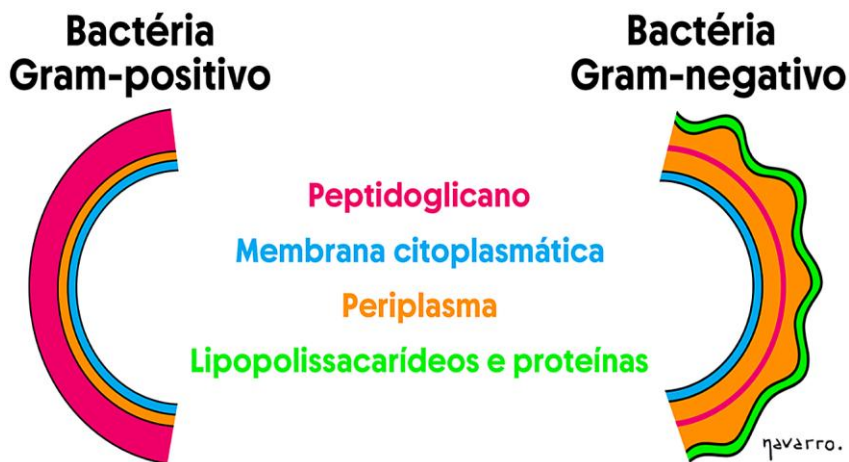


As **bactérias Gram-Negativo** são mais complexas do que as Gram-positivo. Possuem uma camada fina de peptidoglicano (~5–10% da parede celular) envolta por uma membrana externa contendo lipídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeo (LPS). Não possuem ácidos teicóicos. O espaço periplásmico difere daquele das bactérias Gram-positivo, é maior (20–40% do volume celular), é rico em enzimas (possui enzimas hidrolíticas, proteínas de transporte e outras proteínas). A membrana externa encontra-se localizada fora da fina camada de peptidoglicano, com lipoproteínas de Braun a conectarem a membrana externa ao peptidoglicano. Os lipopolissacarídeos (LPS) são componentes-chave da membrana externa das bactérias Gram-negativo, sendo compostos por três partes: lipídeos A, polissacarídeo central e cadeia lateral O (antígeno O). O lipídeo A encontra-se ancorado na membrana externa; os polissacarídeos centrais e a cadeia lateral O estendem-se para fora da célula. Os lipopolissacarídeos contribuem para a carga negativa na superfície celular, ajudam a estabilizar a estrutura da membrana externa, podem contribuir para a fixação em superfícies e formação de biofilme, criam uma

barreira de permeabilidade, conferem proteção contra as defesas do hospedeiro (antígeno O) e podem atuar como uma endotoxina (lipídeo A).

Na Figura 3 pode encontrar-se uma representação esquemática das diferenças entre os envelopes celulares de células Gram-positivo e células Gram-negativo.

Figura 3 — Representação esquemática das diferenças entre os envelopes celulares de uma célula Gram-positivo e de uma célula Gram-negativo



Fonte: elaborada por Lucas Navarro




1.3 Estruturas citoplasmáticas

O citoplasma (Figura 2) abriga componentes essenciais, como: citoesqueleto, membranas intracitoplasmáticas, inclusões, ribossomas, nucleóide e plasmídeos.

As bactérias apresentam um cromossomo circular, que é constituído por uma única molécula de DNA de dupla hélice (dsDNA, ou bicatenário), ou corpo cromatínico. É possível, por vezes, evidenciar mais de um cromossoma numa bactéria em fase de crescimento, uma vez que a sua divisão precede a divisão celular. O cromossoma bacteriano contém todas as informações necessárias à sobrevivência da célula e é capaz de se auto-replicar.

Existe ainda no citoplasma de muitas bactérias, moléculas menores de DNA, também circulares, cujos genes não codificam características essenciais, porém muitas vezes conferem vantagens competitivas à bactéria que as possui. Estes elementos extracromossômicos, denominados plasmídeos, são autônomos, isto é, têm a capacidade de autoduplicação independente da replicação do cromossoma




e podem existir em número variável no citoplasma bacteriano.

Os ribossomas encontram-se espalhados no interior da célula e conferem uma aparência granular ao citoplasma, sendo constituídos por duas subunidades, 30S e 50S, que no início da síntese proteica se reúnem formando a partícula ribossômica completa de 70S (S é a unidade Svedberg de sedimentação).

1.4 Estruturas externas

As estruturas externas estendem-se para além do envelope celular e estão envolvidas na proteção, fixação a superfícies, transferência horizontal de genes, motilidade celular (pili e fímbrias, e flagelos). As fímbrias/pili são estruturas curtas, semelhantes a pelos, para fixação a superfícies, motilidade e captação de DNA; os pili sexuais são mais longos, estando envolvidos na conjugação, e são codificados por plasmídeos. Os flagelos são apêndices filiformes para motilidade e comportamento de enxameação (*swarming*), fixação a superfícies e virulência. Os flagelos podem apresentar vários padrões: monotríquio polar (um



flagelo), anfitríquio (um flagelo em cada extremidade da célula), lofotríquio (agrupamentos de flagelos aglomerados em uma ou em ambas as extremidades da célula), e peritríquio (flagelos espalhados ao longo de toda a superfície celular).


Os flagelos são filamentos finos que se estendem para fora da membrana citoplasmática atravessando a parede celular, apresentando função locomotora. O padrão de fixação flagelar e a disposição no corpo bacteriano é uma característica importante para a classificação bacteriana.

1.5 Permeabilidade da membrana externa

A membrana externa de bactérias Gram-negativo é mais permeável devido à presença de proteínas porinas e proteínas de transporte, que formam canais e permitem a passagem de pequenas moléculas (600-700 Daltons).

1.6 Mecanismo da coloração de Gram

Os compostos orgânicos coloridos usados para corar as bactérias ligam-se a compostos químicos específicos nas células e identificam microrganismos similares. A técnica




inicia-se com o esfregaço, uma camada fina de material sobre uma lâmina de vidro. Geralmente, fixa-se pelo calor, passando a lâmina brevemente pela chama. A coloração de Gram é altamente importante neste sentido, sendo usada como coloração diferencial. A técnica foi descrita em 1884 por Christian Gram na Dinamarca.

Na técnica de coloração de Gram, o esfregaço bacteriano é tratado sequencialmente com os seguintes reagentes: (i) corante púrpura cristal violeta; (ii) solução de iodo (fixa o corante no interior da célula); (iii) álcool (descolorante que remove o corante de parte das bactérias); (iv) corante vermelho safranina.

A diferença de coloração final, que distingue bactérias Gram-positivo (violeta-azuladas) de bactérias Gram-negativo (vermelhas), deve-se à espessura e composição da parede bacteriana.

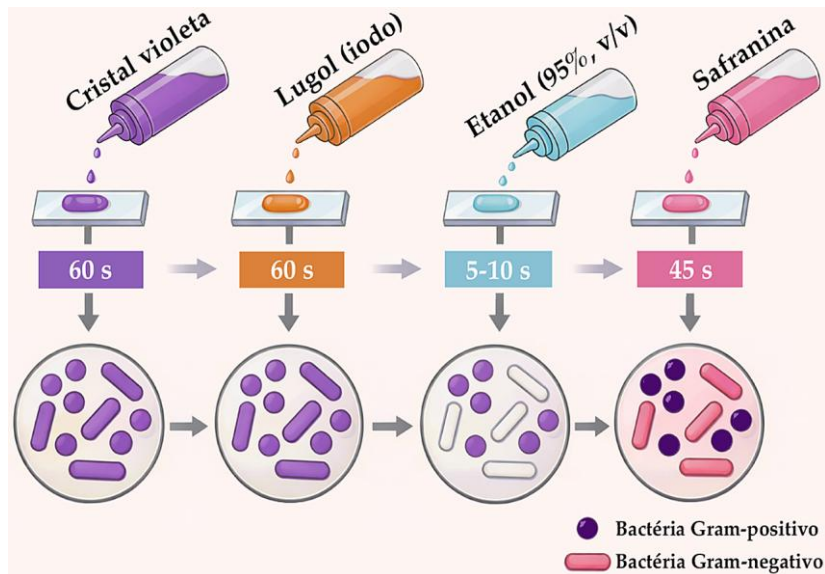
A reação de coloração de Gram deve-se à natureza da parede celular bacteriana. As bactérias Gram-positivo são resistentes à descoloração pelo álcool. Durante o processo de coloração de Gram, as células são tratadas com cristal violeta e em seguida com solução de iodo (lugol), o que



resulta na formação de um complexo cristal violeta-iodo dentro das células. Quando as bactérias Gram-negativo são tratadas com álcool (etanol), o lipídeo na membrana externa é dissolvido e removido, levando ao rompimento da membrana externa e aumentando a sua permeabilidade. Em células Gram-negativo, a camada mais fina de peptidoglicano e os poros maiores não impedem a perda de cristal violeta. Assim, o complexo corante pode ser removido, decolorando a bactéria Gram-negativo que pode então ser tingida com o corante de fundo vermelho (safranina). Nas bactérias Gram-positivo, o etanol faz com que os poros no peptidoglicano se contraíam, com a constrição a impedir a perda do complexo corante violeta-iodo que permanece assim no interior.

Na Figura 4 pode encontrar-se uma representação esquemática do processo da coloração de Gram em quatro etapas.


Figura 4 — Representação esquemática do processo da coloração de Gram em quatro etapas



Fonte: imagem gerada parcialmente com recurso de Inteligência Artificial Generativa (chatGPT-4o)

1.7 Componentes externos à parede celular

Os componentes externos à parede celular incluem o glicocálice (cápsulas e camadas de limo, e camadas S), e ajudam na ligação a superfícies sólidas (por exemplo, biofilmes em plantas e animais). O glicocálice é um material viscoso circundante, podendo ser uma cápsula (exemplo de cápsula é a formada pelo *Streptococcus mutans*, agente da



cárie dentária) ou uma camada limosa. As cápsulas são compostas por polissacarídeos, são bem organizadas e difíceis de remover da célula, oferecendo vantagens protetoras como resistência à fagocitose, proteção contra a dessecação, e exclusão de vírus e detergentes. As camadas de limo são semelhantes às cápsulas, mas são difusas, desorganizadas e facilmente removíveis, auxiliando na motilidade celular. As camadas S são compostas por camadas de proteína ou glicoproteína que se automontam em camadas estruturadas. As funções das camadas S incluem proteção contra estresse ambiental (flutuações de pH, íons, estresse osmótico, enzimas e predação), manutenção de forma e rigidez estrutural, promoção de adesão a superfícies, e proteção contra defesas do hospedeiro.

1.8 Motilidade bacteriana

As bactérias apresentam vários tipos de motilidade: (i) movimento flagelar (rotação semelhante a uma hélice), (ii) rotação anti-horário (movimento para a frente ou movimento de tombamento), (iii) motilidade de



espiroquetas (fibrilas axiais dentro da bainha externa, com movimento em “saca-rolhas”), (iv) contração muscular (movimentos curtos e espasmódicos com pelos), e (v) deslizamento (movimento suave, possivelmente envolvendo limo).

As bactérias podem também mover-se por quimiotaxia (movimento em resposta a estímulos químicos). As bactérias movem-se em direção a atrativos (por exemplo, nutrientes) e se afastam de repelentes, podendo responder à temperatura, luz, oxigênio e gravidade.




2 REGRAS DE SEGURANÇA NUM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Em um laboratório de Microbiologia/Biotecnologia, onde são realizados testes com microrganismos, as condições de higiene e limpeza devem ser rigorosas. As diretrizes abaixo abrangem os perigos encontrados durante a realização de atividades em um laboratório de Microbiologia (Balcão; Amorim, 2012).

Antes de iniciar um experimento, certifique-se de ter lido e entendido as informações de segurança. Sempre pergunte ao seu orientador/supervisor se você tiver dúvidas sobre esses ou outros regulamentos de segurança.

TRAJE

- Sapatos que cubram totalmente seus pés devem ser usados o tempo todo.
- Roupas que cobrem suas pernas e tronco devem ser usadas o tempo todo.

- 
- O cabelo longo deve ser contido.
 - Colares longos ou brincos longos não devem ser usados em um laboratório.
 - Para proteção pessoal, recomenda-se a utilização de luvas de nitrilo, jaleco branco (cor que permite observar algum derrame acidental de líquido) e proteções oculares.

ALIMENTAÇÃO

- Comer, beber, fumar, mascar tabaco e aplicar cosméticos são proibidos no laboratório.
- Nunca prove nenhum material no laboratório.

PROTEÇÃO PARA OS OLHOS

- Óculos de segurança aprovados devem ser usados o tempo todo.
- Se o experimento exigir que você use um protetor facial, ele só deve ser usado sobre seus óculos de proteção ou outros óculos aprovados.




PROTEÇÃO PARA AS MÃOS

- Luvas de nitrilo descartáveis devem ser usadas sempre que necessário.
- A espessura e o material devem ser apropriados para os reagentes que estão sendo usados.
- Caso suas luvas entrem em contato com um reagente químico, remova-as imediatamente e jogue fora, lave as mãos.
- Sempre lave as mãos com água e sabão antes de sair do laboratório.
- Sempre desinfecte as mãos com etanol a 70% (v/v) antes de sair do laboratório.

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

- Não cabe a você determinar qual material pode ir pelo esgoto.
- Sempre leia a descrição do seu experimento e ouça seu orientador/ supervisor para os procedimentos de descarte.

- 
- Se você ainda não tiver certeza, pergunte ao seu orientador/supervisor.

EQUIPAMENTO DE SEGURANÇA E EVACUAÇÃO

- Você deve saber a localização e o uso de equipamentos de segurança, como lavagem dos olhos, chuveiro de segurança, extintor de incêndio e telefone antes de começar a trabalhar em seu experimento.
- Você deve saber a localização de todas as saídas no laboratório em caso de saída de emergência.
- Relate TODOS os derramamentos e acidentes ao seu orientador/ supervisor imediatamente.

É sua responsabilidade ler e cumprir as informações de segurança do laboratório apresentadas pelo seu livro didático ou pelo seu orientador/supervisor.




2.1 Limpeza de materiais de laboratório

Para se conseguir uma desinfecção ou esterilização adequada, é necessário proceder a uma limpeza prévia do material que irá ser utilizado.

Apresentam-se em seguida algumas classes de germicidas químicos comumente utilizados num laboratório de microbiologia.

- **Cloro (hipoclorito de sódio).** O cloro é um germicida químico facilmente disponível e com vasto campo de ação. Para ação desinfetante de uso geral, deve ter uma concentração de cloro ativo de 1 g L^{-1} . Para o caso de derrames que representem riscos biológicos e na presença de grandes quantidades de matéria orgânica, recomenda-se uma solução mais forte contendo 5 g L^{-1} de cloro ativo. As soluções de hipoclorito de sódio, como a lixívia doméstica, contêm 50 g L^{-1} de cloro ativo e devem, por isso, ser diluídas a 1:50 ou 1:10 para se obterem concentrações finais de 1 g L^{-1} e 5 g L^{-1} , respectivamente. A lixívia pode ser utilizada como desinfetante universal e para mergulhar materiais contaminados que não contenham partes metálicas.

- 
- **Álcoois.** O etanol (álcool etílico, C_2H_5OH) e o 2-propanol (álcool isopropílico, $(CH_3)_2CHOH$) apresentam propriedades desinfetantes similares. São ativos contra bactérias vegetativas, fungos filamentosos e vírus lipídicos, mas não contra esporos. Para maior eficácia, devem ser utilizados em concentrações próximas de 70 % (v/v) em água desionizada. Uma vantagem importante das soluções aquosas de álcoois é não deixarem resíduos nos objetos tratados. Os álcoois são voláteis e inflamáveis e não devem ser utilizados perto de chamas. As soluções de trabalho devem ser armazenadas em recipientes apropriados para evitar a evaporação.

2.2 Descontaminação do local de trabalho

Para superfícies pode utilizar-se uma solução de hipoclorito de sódio ($NaOCl$) contendo 1 g L^{-1} de cloro ativo, mas para situações de grande risco recomendam-se soluções mais fortes (5 g L^{-1}). Para descontaminação do meio ambiente, soluções contendo 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também podem ser utilizadas.



2.3 Descontaminação de cabines de segurança biológica


Para uso rotineiro, 15 min antes de se iniciarem quaisquer procedimentos experimentais, deve ligar-se a luz ultravioleta (lâmpada UV) e, na sequência, descontaminar a superfície da cabine de segurança biológica com gaze embebida em álcool etílico ou isopropílico a 70% (v/v).

2.4 Lavagem e/ou descontaminação das mãos

Para manipular materiais que apresentam riscos biológicos, deve-se utilizar luvas apropriadas (nitrilo). Contudo, isto não elimina a necessidade de lavar as mãos regularmente com água e sabão. As mãos devem ser completamente cobertas de espuma de sabão e esfregadas durante pelo menos 10 s, passadas por água limpa e secas utilizando papel ou toalha limpos. Podem também esfregar-se produtos à base de álcool.

2.5 Desinfecção e esterilização pelo calor em autoclave

A esterilização por vapor saturado sob pressão (autoclave) é o meio mais eficaz e seguro de esterilizar materiais de laboratório. Ciclos de: **(i)** 3 min a 134 °C; **(ii)** 10



min a 126 °C; **(iii)** 30 min a 121 °C; ou **(iv)** 25 min a 115 °C, assegurarão a esterilização de materiais carregados em autoclave.

2.6 Manipulação de mostras biológicas e ambientais

A coleta, o transporte e a manipulação de forma inadequada de amostras biológicas e ambientais em laboratório representam um risco de contaminação para as pessoas envolvidas. Os recipientes de amostras devem ser de vidro ou, de preferência, de plástico resistente, devendo ser corretamente lacrados e identificados (com nome da amostra, data, nome da pessoa que obteve a amostra e, se possível, coordenadas geográficas do local de amostragem).

Os recipientes contendo amostras biológicas devem ser abertos em cabine de segurança biológica, tendo à disposição desinfetantes. O uso de luvas de nitrilo e jaleco é obrigatório. Também se recomenda o uso de óculos de proteção.



2.7 Descarte

O descarte de materiais contaminados em ambientes laboratoriais deixou de ser uma etapa meramente operacional. Em tempos de avanço científico acelerado e crescente preocupação ambiental, esse processo tornou-se estratégico, exigindo inovação, rastreabilidade e compromisso ético. Laboratórios de microbiologia/biotecnologia lidam diariamente com resíduos que, se mal gerenciados, representam riscos biológicos significativos. Por isso, os procedimentos de descarte precisam combinar eficácia microbiológica, segurança do operador, respeito às normas legais e responsabilidade ambiental.

O primeiro passo é a classificação criteriosa dos resíduos, identificando a natureza do material, o tipo de microrganismo associado e o protocolo de descarte correspondente.

Todo o material potencialmente contaminado deve ser acondicionado imediatamente após o uso, utilizando contentores autoclaváveis ou sacos biocompatíveis



termossensíveis, que se degradam em processos térmicos, sem gerar resíduos tóxicos.

A abordagem moderna prioriza a descontaminação prévia no próprio laboratório quando possível, antes do envio ao descarte final. Exemplos de técnicas adaptadas ao risco: autoclavagem interna, para resíduos de baixo e médio risco; inativação química controlada com desinfetantes de última geração, como peróxidos estabilizados; neutralização enzimática, especialmente para resíduos orgânicos líquidos.

Após descontaminação, os materiais podem seguir para reciclagem (se permitido), incineração em unidades licenciadas, ou aterros sanitários controlados, no caso de materiais já esterilizados e não recicláveis.



3 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E TAMPÕES

Para a preparação de meios de cultura, deve-se seguir a orientação dos fabricantes e usar técnicas assépticas (Sanders, 2012). Todos os meios de cultura e soluções, e materiais diversos como tubos Eppendorf[®], tubos de ensaio, tubos tipo Falcon, pinças, ponteiras de micropipetas, tiras de papel de filtro, papel de filtro, frascos Schott[®], entre outros, devem ser esterilizados em autoclave durante 30 min a 121 °C sob 1 atm de pressão.

3.1 Meio sólido *Tryptic Soy Agar (TSA)*

Pesar 24 g de meio TSB e 9,6 g de ágar bacteriológico e adicionar 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott[®] de 1 L. Após esterilização em autoclave, o meio de cultura deve ser vertido em placas de Petri descartáveis de 9 cm (ou 6 cm) de diâmetro. Uma vez solidificado o meio, as placas devem ser armazenadas invertidas a 4 °C até utilização.



3.2 Caldo Tryptic Soy Broth (TSB)


Dissolver 24 g de meio de cultura TSB em 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott® de 1 L. O caldo deve ser esterilizado em autoclave e armazenado a 4 °C até utilização.

3.3 Caldo Tryptic Soy Broth Double Concentration (TSB 2x)

Dissolver 48 g de meio de cultura TSB em 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott® de 1 L. O caldo deve ser esterilizado em autoclave e armazenado a 4 °C até utilização.

3.4 Tampão *Phosphate Buffer Saline* (PBS) concentrado [10×] e tampão PBS [1×]

Pesar 82 g de cloreto de sódio (NaCl), 10,5 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e 3,55 g de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄). Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água ultrapura. Para preparação do tampão PBS [1×], transferir 100 mL do tampão PBS [10×] para balão volumétrico de



1000 mL de capacidade e completar o volume com água ultrapura.

3.5 Solução salina 0,9% (m/m)


Pesar 3,6 g de cloreto de sódio (NaCl) e dissolver em 400 mL de água ultrapura. A solução resultante deve ser transferida para frasco Schott® de 500 mL de capacidade e esterilizada em autoclave. Esta solução deverá ser armazenada a 4 °C até utilização.



4 TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO

O isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, sólidas ou líquidas, constitui uma etapa elementar e estratégica na microbiologia, pois permite a caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos com funções cruciais em processos ecológicos, industriais e clínicos. Esta prática, apesar de tradicional, continua em constante evolução e representa uma ponte entre a biodiversidade microbiana natural e sua exploração biotecnológica racional.


Todos os ensaios devem ser realizados seguindo rigorosamente a técnica asséptica (Sanders, 2012) e em cabine de segurança biológica, obedecendo às normas de segurança e conduta num laboratório de microbiologia, pois este equipamento ajuda a proteger reagentes e culturas biológicas de contaminação, assim como o pesquisador. A parte mais importante de uma cabine de segurança



biológica consiste num sistema de retenção de bactérias de alta eficiência, um filtro HEPA (*high efficiency particulate arrest*) que pode reter um mínimo de 99,97% de poeira, pólen, fungos, bactérias e quaisquer partículas transportadas pelo ar que tenham um tamanho superior a 0,3 μm , a um fluxo de 85 litros por min (Bykowski *et al.*, 2012).


Ambientes naturais — como solos, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas — abrigam comunidades bacterianas altamente diversificadas e dinamicamente estruturadas, em função de fatores físico-químicos e interações microbianas complexas. No entanto, a obtenção de cultivos bacterianos puros a partir desses nichos requer metodologias que respeitem as limitações ecológicas dos microrganismos e a seletividade dos meios de cultivo utilizados. Tal desafio é exacerbado pelo chamado “paradoxo da cultivabilidade”, uma vez que a maior parte das bactérias ambientais não cresce sob as condições padrão de laboratório (Stewart, 2012).

Historicamente, técnicas de cultivo em meio sólido, como aquelas introduzidas por Koch no século XIX, permitiram os primeiros avanços na microbiologia. Hoje,



porém, essas técnicas são complementadas por abordagens que visam aumentar a recuperabilidade de táxons minoritários ou de crescimento lento, como a utilização de meios com nutrientes diluídos, o emprego de condições de cultivo simulando o ambiente original, ou o encapsulamento celular *in situ*, como no dispositivo iChip (Berdy *et al.*, 2017; Nichols *et al.*, 2008). Além disso, técnicas como o pré-tratamento térmico ou o uso de antibióticos seletivos podem suprimir populações dominantes e favorecer a emergência de linhagens-alvo específicas (Marcoletas *et al.*, 2019).

A escolha do protocolo de isolamento depende fortemente do tipo de amostra. Em ambientes aquáticos, a filtração e a centrifugação são métodos-chave para concentrar as células antes da inoculação. Já em amostras sólidas, como solos ou resíduos orgânicos, a suspensão em solução tamponada e a serialização de diluições são procedimentos rotineiros. Em ambos os casos, o isolamento deve ser seguido por etapas de purificação e caracterização taxonômica, o que inclui análises morfológicas, bioquímicas e, cada vez mais, moleculares, como a amplificação do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004).




O interesse crescente por microrganismos não cultiváveis, entretanto, não deve obscurecer o valor dos isolados bacterianos. A obtenção de culturas puras ainda é indispensável para testes de resistência antimicrobiana, produção de metabólitos bioativos, biorremediação, e isolamento de bacteriófagos.

Em síntese, o isolamento bacteriano permanece como ferramenta fundamental para a compreensão e aplicação do mundo microbiano. A adaptação dos protocolos às especificidades das amostras e dos objetivos científicos amplia não apenas a eficiência do processo, mas também o horizonte de descobertas microbiológicas.

4.1 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras sólidas: solo

O solo é um dos ecossistemas mais complexos e dinâmicos do planeta, funcionando como um reservatório natural de diversidade microbiana. Entre os microrganismos presentes, as bactérias desempenham papéis fundamentais em processos ecológicos essenciais, como o ciclo do nitrogênio, a decomposição da matéria orgânica, a formação



de húmus e a manutenção da fertilidade do solo (Fierer; Jackson, 2006). Estima-se que uma única grama de solo contenha entre 10^7 e 10^9 células bacterianas e milhares de espécies distintas, muitas das quais ainda não foram cultivadas ou caracterizadas em laboratório (Torsvik; Øvreås, 2002).

O estudo da bacteriologia do solo envolve a identificação, quantificação e caracterização funcional das populações bacterianas presentes em amostras sólidas. A abordagem tradicional baseia-se no isolamento de bactérias viáveis por meio de técnicas de diluição e cultivo em meios de cultura, seguidas por análises fenotípicas e moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA (Janssen, 2006). No entanto, devido à grande diversidade metabólica e à presença de muitas bactérias de crescimento lento ou exigente, apenas uma fração da microbiota do solo é cultivável com os métodos clássicos (Epstein, 2013).

Apesar dessas limitações, a bacteriologia do solo continua a ser uma área estratégica para diversas aplicações, incluindo o controle biológico de pragas, o desenvolvimento de biofertilizantes e a descoberta de novas enzimas e

metabólitos de interesse biotecnológico. Além disso, o isolamento de bactérias do solo é um passo essencial na busca por hospedeiros específicos para o isolamento de bacteriófagos ambientais, com potencial uso em terapias fágicas e controle microbiano (Clokie; Kropinski, 2009).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Cicloheximida ou outro antifúngico para adicionar aos meios (opcional)
Amostra de solo	Meio de cultura líquido TSB
Frascos Erlenmeyer estéreis ou tubos de grande volume	Diluinte estéril, sendo possível utilizar Solução Salina 0,85%, Tampão Fosfato Salino -PBS pH 7.2, Água Peptonada 0,1%
Frascos Schott® de 125 mL	Meios de cultura (Ágar Nutriente – AN ou Ágar Triptona de Soja – TSA, Ágar R2A)
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis) estéreis	
Alças de Drigalski estéreis	
Placas de Petri estéreis	
Estufa de incubação bacteriológica	
Agitador orbital	



Procedimento experimental

a) Coleta e preparo da amostra

- a1)** Coletar amostras de solo da área de estudo com ferramentas limpas e estéreis.
- a2)** Homogeneizar a amostra de solo com diluente estéril (solução salina a 0,85% (m/v) ou água peptonada a 0,1% (m/v)) e remover pedras e raízes grandes.

b) Preparação da suspensão Inicial

- b1)** Pesar 10 g da amostra de solo em um recipiente estéril.
- b2)** Agitar vigorosamente em agitador orbital, entre 150-200 rpm pelo período de 20-30 min.
- b3)** Deixar a suspensão decantar por 5 minutos para separar partículas maiores das menores, após a decantação colete o sobrenadante da solução.



c) Diluições seriadas

c1) A partir da suspensão inicial (se possuir partículas finas) ou do sobrenadante (no caso de ter sido necessário esperar as partículas maiores decantarem) preparar diluições decimais 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em recipientes estéreis.

c2) Para cada diluição, transferir 1 ml da diluição anterior para 9 mL de diluente estéril e homogeneizar.

d) Plaqueamento


d1) A partir de 2 a 3 diluições selecionadas, molhar a ponta da alça de Drigalski e passá-la por toda a superfície da placa de ágar.

d2) Preparar placas em duplicatas ou triplicatas para cada diluição.

e) Incubação, isolamento e purificação


e1) Incubar as placas invertidas a uma temperatura entre 25-37 °C por 2-7 dias.


e2) Após a incubação, selecionar placas com colônias bem isoladas.

- 
- e3)** Observar a diversidade morfológica das colônias (tamanho, forma, cor, textura) e escolher aquela que apresente as características de interesse.
- e4)** Após ter selecionado as colônias de interesse, toque com uma alça de repicagem e faça o estriamento na placa de ágar TSA para ter uma nova placa de cultura pura.
- e5)** Incube novamente a temperatura escolhida (entre 25-37 °C) e espere entre 2-7 dias. Repita o isolamento se necessário.

f) Seleção de patógenos

- f1)** *Enterococcus faecium*: Utilizar os meios seletivos KF Streptococcus Ágar, Bile Esculin Azide Ágar (BEAA) ou Slanetz and Bartley Ágar (Enterococcus Ágar), incubar por 37 °C por 1-2 dias.
- f2)** *Staphylococcus aureus*: Utilizar os meios seletivos Baird-Parker Ágar (BPA) ou Mannitol Salt Ágar (MAS), incubar por 37 °C por 1-2 dias.

- 
- f3)** *Klebsiella pneumoniae*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Eosin Methylene Blue Ágar (EMB Ágar), Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBG Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- f4)** *Acinetobacter baumannii*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Leeds Acinetobacter Medium (LAM), Herellea Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- f5)** *Pseudomonas aeruginosa*: Utilizar os meios seletivos Pseudomonas Ágar P ou Pseudomonas Ágar F, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- f6)** *Escherichia coli*: Utilizar os meios seletivos EMB Ágar ou TBX Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- f7)** *Salmonella enterica*: Utilizar os meios seletivos HE Ágar (Hektoen Enteric Ágar) e BSA (Bismuth Sulfite Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- f8)** *Xanthomonas citri* pv. *citri*: Utilizar o meio seletivo XCSM (*Xanthomonas citri* Selective Medium), incubar a 28 °C por 1-2 dias.
- f9)** *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: Utilizar os meios seletivos XCSM (*Xanthomonas citri* Selective



Medium) ou YDC Ágar (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Ágar), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

f10) *Pseudomonas coronafaciens pv. garcae*: Utilizar o meio seletivo King's B Ágar (KB), incubar por 28 °C por 1-2 dias.

f11) *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*: Utilizar o meio seletivo PSM (*Pseudomonas syringae* Medium), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

f12) *Erwinia amylovora*: Utilizar o meio seletivo MS (Miller and Schroth Medium), incubar por 28 °C por 1-2 dias.

f13) *Xylella fastidiosa*: Utilizar os meios seletivo PD2 (*Periwinkle Dextrose Medium*) ou PWG (*Periwinkle Wilt Broth with Gelrite*), incubar a 28 °C por 1 a 2 semanas.

f14) *Ralstonia solanacearum*: Utilizar o meio seletivo SMSA (*Selective Medium for Ralstonia solanacearum* Ágar), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

Na Figura 5 pode observar-se de forma esquemática e integrada o procedimento descrito nas etapas [a]-[f].

Figura 5 — Ilustração do protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de solo




Fonte: elaborada por Lucas Navarro



4.2 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras líquidas: esgoto e rio

A análise bacteriológica de amostras líquidas, como esgoto e água de rios, é uma ferramenta essencial para a compreensão da qualidade ambiental, saúde pública e dinâmica ecológica dos sistemas aquáticos. Esses ambientes aquáticos funcionam como *habitats* e veículos para diversas comunidades bacterianas, que incluem tanto organismos benéficos quanto patógenos potenciais (Ashbolt, 2004). As bactérias presentes em águas residuais e naturais refletem a carga orgânica, o nível de poluição, a presença de contaminantes químicos e o impacto das atividades antrópicas, como o lançamento de esgotos não tratados e o uso agrícola intensivo (Vaz-Moreira *et al.*, 2014).

No esgoto, predominam comunidades bacterianas associadas à degradação de matéria orgânica e nutrientes, como as pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia*, sendo este último frequentemente usado como indicador de contaminação fecal (Tallon *et al.*, 2005). Já em rios, a composição bacteriana é mais variável e depende de fatores como a correnteza, a origem da água, a



presença de sedimentos e as condições físico-químicas (Crump *et al.*, 2007). A presença de antibióticos e metais pesados nesses ambientes também pode selecionar por cepas bacterianas resistentes, ampliando os riscos para a saúde ambiental e humana (Baquero *et al.*, 2008).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Meios de cultura: Ágar Nutriente -NA ou Ágar Triptona de Soja-TSA
Amostra de esgoto ou rio	Meio de cultura líquido TSB
Frasco de coleta estéril	Tiosulfato de sódio para neutralizar cloro residual (opcional).
Frascos Schott® de 125 mL	Diluyente estéril: Tampão Fosfato Tamponado – PBS ou Água Peptonada, 1%
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	
Placas de Petri estéreis	
Equipamento de filtração em membrana: Funil, base bomba de vácuo e membranas estéreis com poro de 0.45µm	
Estufa de incubação bacteriológica	



Procedimento experimental

a) Coleta e preparo da amostra

- a1)** Coletar a amostra de água em frasco estéril.
- a2)** Se houver suspeita de cloro residual, adicionar tiosulfato de sódio estéril ao frasco de coleta antes da amostragem para neutralizá-lo.
- a3)** Transportar a amostra ao laboratório sob refrigeração 1-4°C, e processar dentro de 6-8 horas.

b) Preparação da amostra e plaqueamento

- b1)** Para águas com alta carga microbiana (esgoto bruto): utilize o método da diluição seriada e plaqueamento em superfície.
- b2)** Homogeneizar a amostra de água por agitação.
- b3)** Preparar diluições seriadas decimais em diluente estéril (Tampão Fosfato Tamponado – PBS ou Água Peptonada 0,1%).
- b4)** A partir de diluições seriadas decimais, pipetar 100 µL na superfície de placas de ágar.



- b5)** Espalhar com alça de Drigalski estéril, preparar duplicatas ou triplicatas.
- b6)** Para águas com baixa carga microbiana (água de rios tratados e menos poluídos): Filtração em membrana 0,45 μm .
- b7)** Montar o aparato de filtração (bomba ou seringa).
- b8)** Filtrar o volume necessário de acordo com a necessidade (1 mL, 10 mL, 100 mL) através de uma membrana filtrante estéril de 0.45 μm .
- b9)** Após a filtração, remover assepticamente a membrana filtrante com uma pinça estéril.
- b10)** Colocar a membrana sobre a superfície de uma placa de ágar, garantindo bom contato e ausência de bolhas de ar. A face da membrana que reteve os microrganismos deve estar voltada para cima.



c) Incubação

c1) Incubar as placas de plaqueamento em superfície invertidas e as placas com membranas sem inverter inicialmente (inverter a placa com membrana após 2-4 horas) a temperatura de 25-37 °C por 2-7 dias.

d) Isolamento ou purificação


d1) Observar as características morfológicas após incubação.

d2) Selecionar as colônias de interesse e estriar novamente em meio TSA ou outro meio nutritivo.

e) Incubação, isolamento e purificação

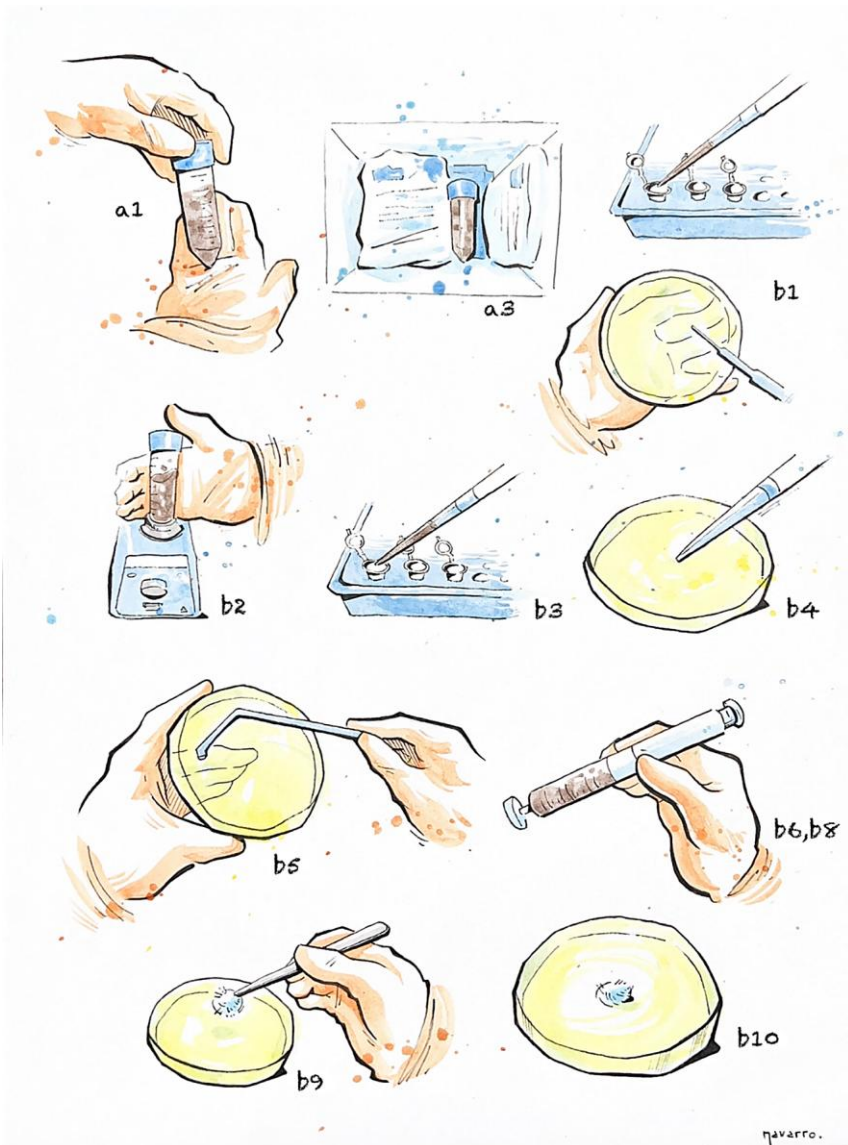
e1) *Enterococcus faecium*: Utilizar os meios seletivos KF Streptococcus Ágar, Bile Esculin Azide Ágar (BEAA) ou Slanetz and Bartley Ágar (Enterococcus Ágar), incubar por 37 °C por 1-2 dias.

e2) *Staphylococcus aureus*: Utilizar os meios seletivos Baird-Parker Ágar (BPA) ou Mannitol Salt Ágar (MAS), incubar por 37 °C por 1-2 dias.

- 
- e3)** *Klebsiella pneumoniae*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Eosin Methylene Blue Ágar (EMB Ágar), Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBG Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- e4)** *Acinetobacter baumannii*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Leeds acinetobacter Medium (LAM), Herellea Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- e5)** *Pseudomonas aeruginosa*: Utilizar os meios seletivos Pseudomonas Ágar P ou Pseudomonas Ágar F, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- e6)** *Escherichia coli*: Utilizar os meios seletivos EMB Ágar ou TBX Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.
- e7)** *Salmonella enterica*: Utilizar os meios seletivos HE Ágar (Hektoen Enteric Ágar) e BSA (Bismuth Sulfite Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.

Na Figura 6 pode observar-se de forma esquemática e integrada o procedimento descrito nas etapas [a]-[e].

Figura 6 — Ilustração do protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de esgoto e rio




Fonte: elaborada por Lucas Navarro



4.3 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras sólidas: tecidos vegetais

Os tecidos vegetais abrigam uma ampla variedade de bactérias que desempenham papéis essenciais na saúde e desenvolvimento das plantas, bem como no equilíbrio ecológico dos agroecossistemas. Essas bactérias podem ser endofíticas, vivendo no interior dos tecidos sem causar danos aparentes, ou epifíticas, habitando a superfície das folhas, caules e raízes (Compant *et al.*, 2010). A análise bacteriológica desses tecidos permite não apenas a detecção de patógenos de interesse agrícola, como *Erwinia*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, mas também a identificação de microrganismos benéficos com potencial para promover o crescimento vegetal, induzir resistência sistêmica e atuar como agentes de biocontrole (Berg *et al.*, 2005).

A caracterização das comunidades bacterianas associadas a tecidos vegetais é realizada por meio de técnicas de isolamento e cultivo, seguida de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA (Lodewyckx *et al.*, 2002). Apesar das limitações impostas pelo viés do cultivo, essas



abordagens ainda são indispensáveis para a obtenção de isolados bacterianos viáveis, particularmente úteis em estudos de interação planta-microrganismo e em aplicações biotecnológicas. Além disso, esses isolados podem ser utilizados como hospedeiros bacterianos para o isolamento de bacteriófagos específicos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle fitopatogênico (Jones *et al.*, 2012).

Este protocolo descreve métodos gerais para o isolamento de bactérias fitopatogênicas associadas a plantas, os quais podem ser classificados em isolamento direto e isolamento indireto. No isolamento direto, as bactérias são obtidas diretamente a partir de tecidos vegetais sintomáticos, por meio de transferência direta do exsudato bacteriano ou de fragmentos de tecido para meios de cultura apropriados, podendo ou não ser precedido por desinfestação superficial, conforme o material analisado. O isolamento indireto envolve uma etapa intermediária de multiplicação do patógeno, geralmente por meio da inoculação em hospedeiros suscetíveis, seguida do

reisolamento a partir dos tecidos que manifestam sintomas característicos.

Material e reagentes


Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Cicloeximida ou outro antifúngico para adicionar aos meios (opcional)
Tubos de ensaio de vidro	Meio de cultura líquido TSB
Frascos Erlenmeyer estéreis ou tubos de grande volume	Diluyente estéril, sendo possível utilizar Solução Salina 0,85%, Tampão Fosfato Salino -PBS pH 7.2, Água Peptonada 0,1%
Frascos Schott® de 125 mL	Meios de cultura (Ágar Nutriente – AN ou Ágar Triptona de Soja – TSA, Ágar R2A)
Micropipeta de 1000 µL	Água desionizada esterilizada
Ponteiras de 1000 µL (azuis) estéreis	Meio 523 de Kado e Heskett (1970)
Alças de Drigalski estéreis	Solução aquosa de NaCl 0,85%
Placas de Petri estéreis	
Estufa de incubação bacteriológica	
Agitador orbital	
Plantas com infecção dos feixes vasculares	
Faca ou facão afiados	
Béquer de 100 mL de volume	
Saco plástico para fazer câmara úmida	
Placas de Petri	



Procedimento experimental

a) Tratamento da amostragem

- a1)** Seccione o caule da planta na zona de coleta e acima da região com sintomas de depressão na casca e lave-o com água e detergente.
- a2)** Faça secções de 12 cm de comprimento em bisel no caule e coloque-as dentro de um béquer com água esterilizada até a metade.
- a3)** Cubra o béquer com saco plástico transparente, amarre-o para formar câmara úmida e mantenha a amostra sobre a bancada do laboratório por 24 h.
- a4)** Proceder para o isolamento direto para placas de Petri contendo meio de cultura, espalhando o pús bacteriano exsudado na superfície do corte, pelo método de estrias.
- a5)** Dilua uma alçada de células em NaCl 0,85% (m/v) até 10^{-6} e semeie 100 mL em meio 523 de Kado e Heskett (1970).




a6) Mantenha as placas a 28 °C por até 72 h e repique colônias individualizadas para tubos de ensaio contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970).

b) Isolamento direto

b1) Lave o órgão vegetal com água e detergente neutro e seque-o com papel toalha ou similar. A seguir, realize duas ou três flambagens após mergulhar o órgão em álcool absoluto. Divida o órgão vegetal em duas metades com o auxílio de um escalpelo previamente flambado de forma a expor os tecidos internos.

b2) A partir de um local distante da periferia do órgão vegetal e do local da incisão, que apresente, no entanto, sintomas ou alterações de cor, rigidez e, ou consistência, retire, com o escalpelo flambado e resfriado, pequenos fragmentos de tecido infectado e deposite-os em uma gota de água esterilizada contida em uma placa de Petri esterilizada.




b3) Macere os fragmentos utilizando um escalpelo previamente esterilizado e, após 20 a 30 min, realize a distribuição da suspensão obtida em placas contendo o meio de cultura para isolamento.

c) Isolamento indireto

c1) Lave cuidadosamente o órgão vegetal infectado com água e sabão neutro e em seguida enxugue-o com papel toalha.

c2) Com o auxílio de um escalpelo previamente flambado, remova parte do tecido infectado e, a partir das bordas da lesão, retire fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm.

c3) Realize a desinfestação dos fragmentos, mergulhando-os em álcool 50% (v/v) por 20 a 30 s, em seguida em solução de hipoclorito de sódio ou de cálcio (2%, m/v) por 1 a 5 min e finalmente remova o excesso dos desinfetantes, lavando os fragmentos ao menos três vezes em água desionizada esterilizada.



c4) Deposite uma gota de água destilada e esterilizada no fundo de uma placa de Petri também esterilizada e transfira três ou quatro fragmentos para essa gota. Com o auxílio de um escalpelo previamente flambado, macere os fragmentos, aguarde 20 a 30 min e realize a semeadura da suspensão obtida na superfície do meio de cultura.

d) Seleção de patógenos

d1) *Xanthomonas citri* pv. *citri*: Utilizar o meio seletivo XCSM (*Xanthomonas citri* Selective Medium), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

d2) *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: Utilizar os meios seletivos XCSM (*Xanthomonas citri* Selective Medium) ou YDC Ágar (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Ágar), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

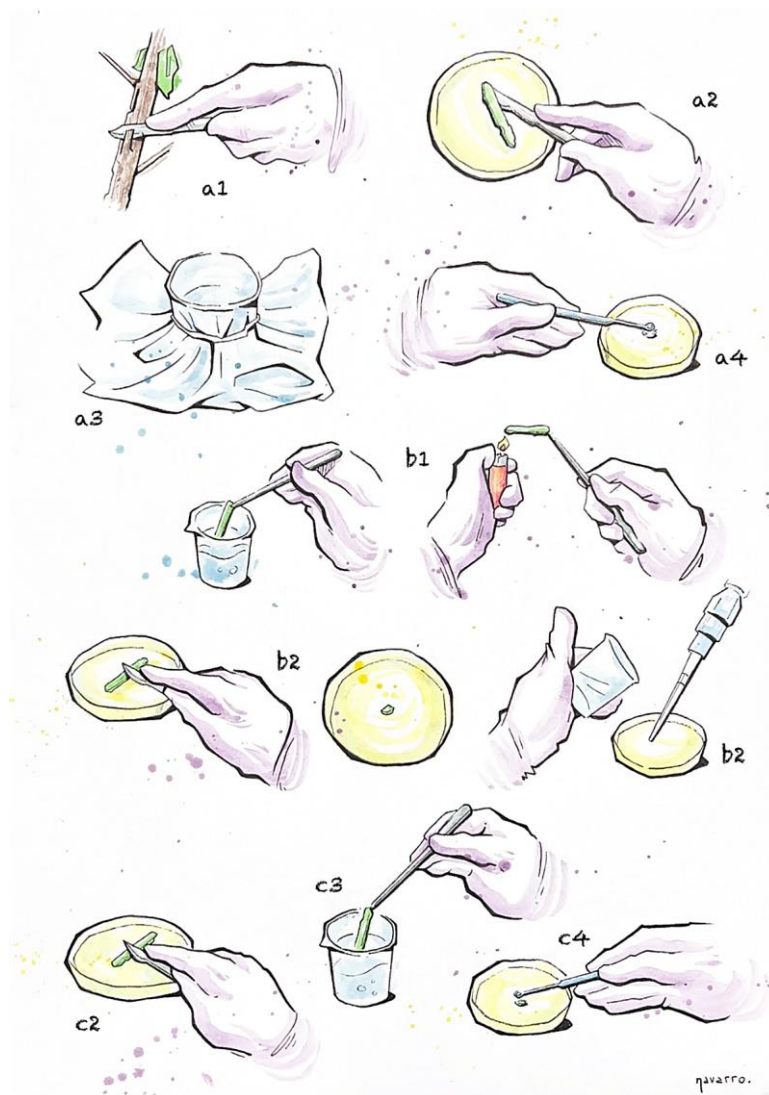
d3) *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*: Utilizar o meio seletivo King's B Ágar (KB), incubar por 28 °C por 1-2 dias.



- d4)** *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Utilizar o meio seletivo PSM (*Pseudomonas syringae* Medium), incubar a 28 °C por 1-2 dias.
- d5)** *Erwinia amylovora*: Utilizar o meio seletivo MS (Miller and Schroth Medium), incubar por 28 °C por 1-2 dias.
- d6)** *Xylella fastidiosa*: Utilizar os meios seletivo PD2 (Periwinkle Dextrose Medium) ou PWG (Periwinkle Wilt Broth with Gelrite), incubar a 28 °C por 1 a 2 semanas.
- d7)** *Ralstonia solanacearum*: Utilizar o meio seletivo SMSA (Selective Medium for *Ralstonia solanacearum* Ágar), incubar a 28 °C por 1-2 dias.

Na Figura 7 pode observar-se de forma esquemática e integrada o procedimento descrito nas etapas (a) - (d).

Figura 7 — Ilustração do protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de tecidos vegetais




Fonte: elaborada por Lucas Navarro



4.4 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos líquidos: ovo e leite

A análise bacteriológica de alimentos líquidos, como o leite e o ovo, é fundamental para garantir a segurança alimentar, controlar surtos de origem alimentar e monitorar a qualidade dos produtos durante a produção e o armazenamento. Esses alimentos são altamente nutritivos e, por isso, também são excelentes substratos para o crescimento bacteriano, podendo abrigar tanto microrganismos deteriorantes quanto patógenos de importância em saúde pública (Oliver *et al.*, 2005). No caso do leite cru, bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 são frequentemente associadas à contaminação, podendo representar riscos significativos caso o produto não seja submetido a tratamentos térmicos adequados (Claeys *et al.*, 2013).

O ovo, especialmente sua casca e conteúdo, também pode ser contaminado por patógenos, sendo *Salmonella* enterica sorotipo Enteritidis um dos principais agentes implicados em surtos alimentares relacionados a esse



alimento (Gantois *et al.*, 2009). As condições de produção, manipulação e armazenamento influenciam diretamente a carga bacteriana, o que torna necessário o uso de protocolos rigorosos de amostragem, isolamento e identificação bacteriana. Tais protocolos incluem o uso de meios seletivos, testes bioquímicos e técnicas moleculares, como PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA, para caracterização precisa das espécies presentes (Quigley *et al.*, 2013).

Essas análises não apenas contribuem para a prevenção de doenças transmitidas por alimentos, mas também oferecem dados essenciais para a formulação de políticas sanitárias, desenvolvimento de produtos lácteos seguros e entendimento da microbiota natural desses alimentos.

Este protocolo define procedimentos necessários para o isolamento de bactérias em matriz alimentícia líquida, sendo utilizadas como amostras a gema e clara do ovo e o leite de vaca cru ou pasteurizado.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Diluyente estéril, como: Água Peptonada Tamponada 0,1% - APT ou Solução Salina 0,85%
Frascos para diluição estéreis	Meios de cultura gerais e nutritivos: Tryptic Soy Agar – TSA ou Nutrient Agar-NA
Frascos Erlenmeyer estéreis ou tubos de grande volume	Meio de cultura líquido TSB
Frascos Schott® de 125 mL	
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis) estéreis	
Alças de Drigalski estéreis	
Placas de Petri estéreis	
Estufa de incubação bacteriológica	
Agitador orbital	
Amostras de ovo ou leite	
Estomacador ou liquidificador	
Sacos estéreis para estomacador (Stomacher)	

Procedimento experimental

a) Preparação da amostra: leite

- a1)** Homogeneizar a amostra de leite agitando vigorosamente o recipiente original (embalagem).
- a2)** Transferir 1 mL de leite para 9 mL de diluyente estéril com o intuito de diluir a 1:10.




b) Preparação da amostra: ovo (conteúdo interno)

- a1)** Desinfetar a superfície externa da casca do ovo com álcool 70% (v/v) e deixar secar.
- b2)** Quebrar o ovo e transferir o conteúdo (gema e clara, podendo ser juntas ou separadas) para um recipiente estéril: Saco de Stomacher ou frasco de liquidificador.
- b3)** Homogeneizar o conteúdo do ovo de forma vigorosa até a amostra estar homogênea.
- b4)** Pesar cerca de 10 mL do conteúdo do ovo homogeneizado e adicionar 90 mL de diluente estéril, com diluição 1:10.
- b5)** Homogeneizar bem a solução de amostra e diluente com Stomacher, liquidificador ou agitação vigorosa.

c) Etapa de pré-enriquecimento não-seletivo (opcional)

- c1)** Se as bactérias na amostra estiverem potencialmente estressas por fatores como o processamento e a refrigeração prolongada, é possível realizar-se uma curta incubação com a diluição inicial de 10^{-1} em



caldo TSB (Tryptic Soy Broth) ou LB (Luria Bertani) por 2-6 horas.

d) Diluições seriadas decimais


d1) A partir da diluição inicial 10^{-1} ou do caldo de pré-enriquecimento, preparar diluições seriadas seguintes de acordo com a necessidade da carga microbiana esperada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e etc.).

d2) Para cada diluição, transferir 1 mL da diluição anterior para 9 mL de diluente estéril e homogeneizar bem.

e) Plaqueamento

e1) A partir de 2 a 3 diluições selecionadas, que se espera uma contagem de colônias entre 25-250 por placa, realizar as técnicas de semeadura em superfície (Spread Plate) ou semeadura em profundidade (Pour Plate).

e2) Técnica de Semeadura em Superfície (Spread Plate): pipetar 100 μ L da diluição desejada em placas de Petri



com o meio desejado (TSA ou NA) e espalhar com alça de Drigalski estéril.

- e3)** Técnica de Semeadura em Profundidade (Pour Plate): pipetar 100 μL da diluição escolhida na placa de Petri vazia e adicionar 15-20 mL do meio de cultura escolhido (TSA, NA) em estado líquido na temperatura de 45 °C, homogeneizar e deixar solidificar.
- e4)** Preparar placas de Petri em duplicatas ou triplicatas para cada diluição semeada.

f) Incubação

- f1)** Incubar as placas invertidas aerobicamente.
- f2)** Incubar entre 30-37 °C por 3-5 dias.
- f3)** Observar o crescimento diariamente, algumas bactérias podem necessitar de um tempo mais longo.




g) Isolamento e purificação de colônias

- g1)** Após a incubação, observar as placas das diferentes diluições.
- g2)** Selecionar colônias com diferentes morfologias (cor, forma, textura).
- g3)** Utilizando uma alça de repicagem estéril, pegar uma colônia bem isolada com as características de interesse e estriar em placas de Petri com meio de cultura TSA ou NA.

h) Seleção de patógenos

- h1)** *Enterococcus faecium*: Utilizar os meios seletivos KF Streptococcus Ágar, Bile Esculin Azide Ágar (BEAA) ou Slanetz and Bartley Ágar (Enterococcus Ágar), incubar por 37 °C por 1-2 dias.
- h2)** *Staphylococcus aureus*: Utilizar os meios seletivos Baird-Parker Ágar (BPA) ou Mannitol Salt Ágar (MAS), incubar por 37 °C por 1-2 dias.
- h3)** *Klebsiella pneumoniae*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Eosin Methylene Blue Ágar (EMB



Ágar), Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBG Ágar),
incubar a 37 °C por 1-2 dias.

h4) *Acinetobacter baumannii*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Leeds acinetobacter Medium (LAM), Herellea Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

h5) *Pseudomonas aeruginosa*: Utilizar os meios seletivos Pseudomonas Ágar P ou Pseudomonas Ágar F, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

h6) *Escherichia coli*: Utilizar os meios seletivos EMB Ágar ou TBX Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

h7) *Salmonella enterica*: Utilizar os meios seletivos HE Ágar (Hektoen Enteric Ágar) e BSA (Bismuth Sulfite Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.

Na Figura 8 pode observar-se de forma esquemática e integrada o procedimento descrito nas etapas [a]-[h].

Figura 8 — Ilustração do protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos líquidos: leite e ovos




Fonte: elaborada por Lucas Navarro



4.5 Protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos sólidos

A bacteriologia aplicada a alimentos sólidos é uma ferramenta essencial na avaliação da segurança, qualidade e vida útil desses produtos. Alimentos como carnes, frutas, vegetais, cereais e produtos processados podem funcionar como veículos de microrganismos patogênicos ou deteriorantes, especialmente quando submetidos a condições inadequadas de higiene, processamento ou armazenamento (Jay *et al.*, 2005). Entre os patógenos mais frequentemente detectados estão *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* O157:H7, todos com potencial de causar surtos alimentares com sérias repercussões em saúde pública (Scallan *et al.*, 2011).

A análise microbiológica de amostras sólidas exige a adoção de protocolos específicos, incluindo homogeneização da amostra, pré-enriquecimento e uso de meios seletivos para isolamento dos microrganismos-alvo. Métodos tradicionais, como cultivo em placa e identificação bioquímica, continuam sendo amplamente utilizados,



embora técnicas moleculares, como a PCR em tempo real e o sequenciamento de DNA, estejam ganhando destaque pela sua maior sensibilidade e especificidade (Zhao *et al.*, 2014). Além disso, o estudo da microbiota presente nos alimentos sólidos permite a identificação de cepas probióticas e a avaliação do impacto de diferentes técnicas de processamento sobre a flora bacteriana, com implicações diretas na qualidade sensorial e nutricional dos produtos.

Com a crescente demanda por alimentos minimamente processados e naturais, compreender a dinâmica microbiana em matrizes sólidas torna-se cada vez mais relevante, tanto para a indústria quanto para órgãos reguladores, visando assegurar um consumo seguro e saudável.

Este protocolo tem como o intuito o isolamento de diversas bactérias presentes em matriz alimentar sólida.


Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Diluyente estéril, como Água Peptonada Tamponada 0,1% - APT ou Solução Salina Peptonada 0,1%
Frascos para diluição estéreis	Meio de cultura líquido TSB
Frascos Erlenmeyer estéreis ou tubos de grande volume	Meios de cultura gerais e nutritivos: Tryptic Soy Agar – TSA ou Nutrient Agar-NA
Frascos Schott® de 125 mL	
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis) estéreis	
Alças de Drigalski estéreis	
Placas de Petri estéreis	
Estufa de incubação bacteriológica	
Agitador orbital	
Estomacador ou liquidificador	
Amostra de alimento sólido	
Sacos estéreis para estomacador (Stomacher) com filtro, ou frascos de liquidificador estéreis	

Procedimento experimental

a) Preparação da amostra e coleta da porção de ensaio

- a1) Limpar e descontaminar a embalagem do alimento com álcool 70% (v/v) e abri-lo em ambiente controlado e estéril.



a2) Após abrir a embalagem, recolher uma porção representativa para o ensaio. Para alimentos heterogêneos, pode ser necessário coletar porções de diferentes partes das amostras e combiná-las, ou analisar múltiplas subamostras.

b) Pesagem e preparação da suspensão inicial

b1) Pesar cerca de 10-25 g da porção utilizada no ensaio e adicionar a um saco Stomacher ou copo de um liquidificador estéril.

b2) Adicionar 90 mL de diluente estéril ou outro volume, seguindo a proporção de diluição 1:10.

b3) Homogeneizar a amostra:

b3a) Stomacher: Processar por 1-2 min na velocidade recomendada pelo fabricante.

b3b) Liquidificador: Homogeneizar em alta velocidade por 1-2 min. Após a homogeneização, aguardar alguns minutos para permitir a sedimentação de partículas maiores e diminuição de aerossóis antes de abrir.



c) Preparação das diluições seriadas

- c1)** A partir da suspensão mãe (10^{-1}), preparar diluições seriadas até o ponto necessário para atingir a quantidade de microrganismos desejada.
- c2)** Para cada etapa de diluição, transferir 1 mL da diluição anterior para um recipiente contendo 9 mL do diluente estéril. Homogeneizar bem cada diluição com um vórtex antes de fazer a próxima diluição (utilize uma ponteira nova para cada transferência).

d) Plaqueamento

- d1)** Selecionar duas ou três diluições consecutivas e apropriadas de acordo com base na carga microbiana esperada no alimento.
- d2)** Realizar o plaqueamento em duplicata ou triplicata para cada diluição selecionada.
- d3)** Técnica de Semeadura em Profundidade (Pour Plate):
 - d3a)** Pipetar 1 mL de cada diluição selecionada para o centro da placa de petri vazia e estéril.



d3b) Adicionar aproximadamente 10 mL de meio de cultura TSA ou NA, fundido e resfriado a 45 °C em cada placa de Petri.

d3c) Misturar cuidadosamente o inóculo com o meio, movimentando a placa em círculos e evitando a formação de bolhas.

d3d) Deixar o ágar solidificar completamente em uma superfície plana e fria.

d4) Técnica de Semeadura em Superfície (Spread Plate):

d4a) Utilizar placas de meio de cultura TSA ou NA previamente preparadas e com superfície seca.

d4b) Pipetar 100 µL de cada diluição selecionada sobre a superfície do ágar.

d4c) Espalhar o inóculo uniformemente sobre toda a superfície do ágar utilizando uma alça de Drigalski estéril.

d4d) Deixar as placas com a tampa entreaberta em capela de fluxo laminar por cerca de 15-30 min (ou até a superfície secar).



e) Incubação


- e1)** Inverter as placas de Petri com o ágar para cima, evitando a formação de condensação sobre o ágar.
- e2)** Incubar as placas aerobiamente na temperatura de 30-37 °C por 24-72 horas.

f) Isolamento e purificação de colônias

- f1)** Após a incubação, observar as placas das diferentes diluições.
- f2)** Selecionar colônias com diferentes morfologias (cor, forma, textura).
- f3)** Utilizando uma alça de repicagem estéril, pegar uma colônia bem isolada com as características de interesse e estriar em placas de Petri com meio de cultura TSA ou NA.

g) Seleção de patógenos

- g1)** *Enterococcus faecium*: Utilizar os meios seletivos KF Streptococcus Ágar, Bile Esculin Azide Ágar (BEAA) ou



Slanetz and Bartley Ágar (Enterococcus Ágar), incubar por 37 °C por 1-2 dias.

g2) *Staphylococcus aureus*: Utilizar os meios seletivos Baird-Parker Ágar (BPA) ou Mannitol Salt Ágar (MAS), incubar por 37 °C por 1-2 dias.

g3) *Klebsiella pneumoniae*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Eosin Methylene Blue Ágar (EMB Ágar), Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBG Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.

g4) *Acinetobacter baumannii*: Utilizar os meios seletivos MacConkey Ágar, Leeds acinetobacter Medium (LAM), Herellea Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

g5) *Pseudomonas aeruginosa*: Utilizar os meios seletivos Pseudomonas Ágar P ou Pseudomonas Ágar F, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

g6) *Escherichia coli*: Utilizar os meios seletivos EMB Ágar ou TBX Ágar, incubar a 37 °C por 1-2 dias.

g7) *Salmonella enterica*: Utilizar os meios seletivos HE Ágar (Hektoen Enteric Ágar) e BSA (Bismuth Sulfite Ágar), incubar a 37 °C por 1-2 dias.

Na Figura 9 pode observar-se de forma esquemática e integrada o procedimento descrito nas etapas (a) – (g).

Figura 9 — Ilustração do protocolo geral para isolamento bacteriano a partir de amostras de alimentos sólidos




Fonte: elaborada por Lucas Navarro



4.6 Curva de crescimento bacteriano

A curva de crescimento bacteriano é uma ferramenta fundamental para compreender a dinâmica populacional de microrganismos em ambientes controlados, como meios de cultura. Essa curva representa graficamente a variação no número de células viáveis ao longo do tempo e é dividida em quatro fases principais: latência (lag), exponencial (log), estacionária e declínio (morte) (Madigan *et al.*, 2021). Cada uma dessas fases reflete mudanças fisiológicas e metabólicas cruciais nas bactérias e fornece dados importantes para aplicações em microbiologia industrial, clínica e ambiental.

Durante a fase de latência, as bactérias adaptam-se ao novo ambiente, ativando mecanismos de reparo e biossíntese, mas sem apresentar multiplicação significativa (Baranyi; Roberts, 1994). A seguir, na fase exponencial, ocorre crescimento celular máximo e constante, sendo o momento ideal para a coleta de dados fisiológicos, como taxas de duplicação e consumo de nutrientes. Na fase estacionária, o crescimento cessa devido ao esgotamento de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos, equilibrando o número de células vivas e mortas. Por fim, a fase de declínio caracteriza-



se pela morte progressiva das células, quando as condições ambientais se tornam inóspitas (Monod, 1949). A análise da curva de crescimento é essencial para o planejamento de experimentos microbiológicos, determinação da eficácia de agentes antimicrobianos, e otimização de processos fermentativos e biotecnológicos. Métodos modernos, como espectrofotometria, contagem de colônias e técnicas moleculares, são amplamente utilizados para monitorar e modelar essas curvas de forma precisa (Dalgaard *et al.*, 1994).


Os conhecimentos das características de crescimento de uma dada bactéria são fundamentais nos estudos com bacteriófagos, pelo que conhecer o período de crescimento exponencial da bactéria hospedeira permite estabelecer o período temporal de contato que melhor favorece a interação fago/bactéria (Harada *et al.*, 2018, 2022; Nabergoj *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2016).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Cubetas de plástico descartáveis de 1,5 mL ou 3,0 mL, com 1 cm de percurso ótico	Meio de cultura líquido TSB
Cubetas de quartzo de 3,0 mL com 1 cm de percurso ótico	
Frascos Schott® de 125 mL	
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	

Procedimento experimental

- a) Para obtenção da curva de crescimento da bactéria hospedeira, deve-se preparar um inóculo de 500 mL de meio TSB da cepa bacteriana hospedeira em Erlenmeyer de 2000 mL **bp-4.6-1** e, em cubetas de plástico descartáveis, realizar leituras em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 610 (ou 600) nm. **bp-4.6-2**
- b) As primeiras leituras devem ser feitas a cada 30 min até completar 5 h de crescimento. Em seguida, as amostras devem ser coletadas para leitura a cada 60 min até completar 12 h de crescimento, e depois após 24 h de crescimento. Os resultados de densidade ótica (OD)

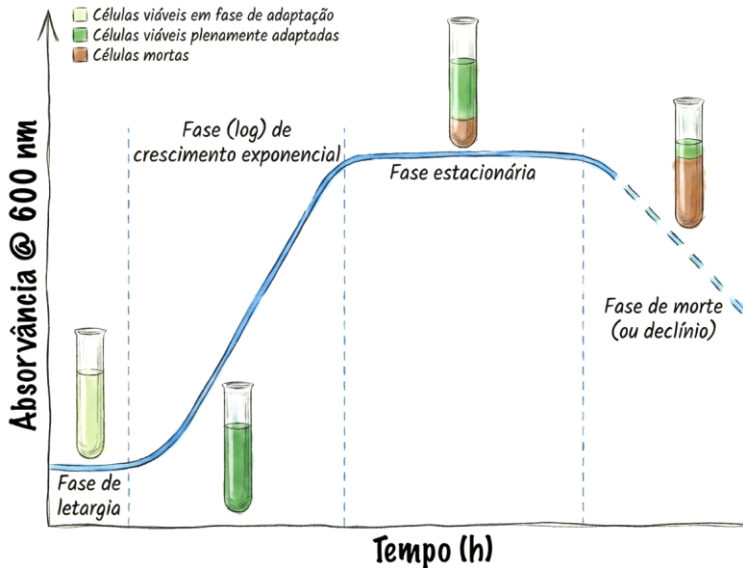


deverão ser convertidos em concentração de biomassa (UFC.mL⁻¹). **bp-4.6-3**

- c)** Com os dados obtidos de concentração de biomassa ao longo do tempo de crescimento, pode-se traçar a curva de crescimento do microrganismo e identificar a fase de crescimento exponencial.
- d)** Pode realizar-se depois um ajuste não-linear da função de Gompertz aos dados de $Abs = f(\text{tempo})$, para ter os parâmetros do crescimento microbiano.

Na Figura 10 pode observar-se de forma esquemática uma curva de crescimento típica de uma cepa bacteriana, com todas as suas fases.

Figura 10 - Curva típica de crescimento de uma cepa bacteriana



Fonte: imagem gerada parcialmente com recurso de Inteligência Artificial Generativa (chatGPT-4o)


Na fase (log) de crescimento exponencial, a taxa de divisão celular é aproximadamente igual à concentração de células jovens em fase de reprodução. Na fase estacionária, a taxa de divisão celular é aproximadamente igual à taxa de morte celular. Na fase de morte (ou declínio), a acumulação de produtos tóxicos e enzimas autolíticas associada à exaustão de nutrientes leva ao declínio na contagem de células viáveis (Figura 10).



5 TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: PROTOCOLOS PARA IDENTIFICAÇÃO

A identificação de isolados bacterianos é uma etapa essencial na microbiologia, particularmente em estudos clínicos, ambientais, industriais e biotecnológicos. Este processo visa determinar a identidade taxonômica de microrganismos obtidos de diversas fontes, fornecendo dados cruciais sobre sua fisiologia, ecologia, potencial patogênico ou aplicabilidade tecnológica (Madigan *et al.*, 2021). Uma abordagem integrada, combinando métodos fenotípicos, bioquímicos e moleculares, é frequentemente empregada para assegurar uma identificação precisa e confiável.

A caracterização fenotípica compreende a observação de aspectos morfológicos, como coloração de Gram, forma celular, tipo de colônia e presença de estruturas extracelulares, além de testes em meios seletivos e diferenciais (Tortora *et al.*, 2020). Na sequência, a análise



bioquímica avalia o perfil metabólico das bactérias, por meio de ensaios que detectam a produção de enzimas, fermentação de substratos e reações específicas a compostos químicos. Sistemas comerciais padronizados, como Galerias API® ou VITEK®, aumentam a reprodutibilidade e a padronização desses testes (Cappuccino; Welsh, 2017).


Mais recentemente, as técnicas de caracterização genômica tornaram-se indispensáveis. A amplificação e o sequenciamento do gene 16S rRNA, em particular, possibilitam uma identificação mais precisa e filogeneticamente informativa, mesmo entre espécies morfologicamente semelhantes (Janda; Abbott, 2007). A conjugação dessas estratégias é particularmente relevante no contexto da pesquisa com bacteriófagos, onde o conhecimento detalhado das cepas bacterianas hospedeiras é fundamental para o sucesso do isolamento viral e desenvolvimento de aplicações terapêuticas ou ambientais.



5.1 Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica bacteriana constitui uma etapa fundamental na identificação e classificação de microrganismos, especialmente em contextos laboratoriais que envolvem a microbiologia clínica, ambiental e industrial. Este processo baseia-se na observação direta das características morfológicas, fisiológicas e comportamentais das bactérias, fornecendo informações iniciais sobre sua identidade e papel ecológico (Madigan *et al.*, 2021).

Entre os principais parâmetros avaliados estão a morfologia celular (forma, tamanho, arranjo), a coloração de Gram, a presença de estruturas como cápsulas, flagelos e esporos, e as características das colônias em meios de cultura (cor, margem, elevação, consistência). Esses dados visuais são complementados por observações de crescimento em diferentes condições ambientais, como temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de oxigênio (Tortora *et al.*, 2020). Além disso, a análise de motilidade, produção de pigmentos, e respostas em meios seletivos e diferenciais pode oferecer pistas adicionais para a distinção entre gêneros e espécies.



Embora a caracterização fenotípica possa não oferecer resolução suficiente para diferenciação entre espécies filogeneticamente próximas, ela permanece essencial como etapa preliminar nos protocolos de identificação. Sua aplicação é particularmente valiosa em laboratórios de ensino, pesquisa básica e triagem inicial de isolados ambientais, permitindo uma triagem eficiente de amostras antes da aplicação de técnicas moleculares mais sofisticadas (Cappuccino; Welsh, 2017).


Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação	Ágar Nutriente ou TSA
Microscópio ótico	Reagentes para a coloração de Gram
Lâminas e lamínulas de vidro	

Procedimento experimental

a) Morfologia de Colônia.

- a1)** Inocular em Ágar Nutriente ou TSA e incubar a 28-37 °C por 24-48 h.
- a2)** Observar e registrar: forma, margem, elevação, cor, brilho e opacidade.



b) Morfologia Celular e Coloração de Gram.

b1) Preparar esfregaço em lâmina e realizar coloração de Gram padrão.

b2) Observar morfologia, agrupamento e reação (Gram positivo ou negativo).

c) Motilidade.

c1) Inocular meio semissólido por picada e incubar por 24-48 h.


c2) Difusão do crescimento indica motilidade positiva.

d) Estruturas externas (opcional).

d1) Avaliar a presença de cápsulas, flagelos ou fímbrias com colorações especiais ou microscopia.

5.2 Caracterização bioquímica


A caracterização bioquímica bacteriana é uma ferramenta central na identificação e classificação de microrganismos, especialmente em ambientes laboratoriais dedicados à microbiologia médica, ambiental e industrial. Esse tipo de análise baseia-se na avaliação do metabolismo bacteriano por meio de testes que detectam a produção de



enzimas específicas, a fermentação ou oxidação de substratos, e a utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio (Cappuccino; Welsh, 2017).

Os testes bioquímicos permitem diferenciar espécies e gêneros bacterianos com base em suas capacidades metabólicas únicas. Entre os testes mais utilizados estão a produção de catalase, oxidase, urease, a fermentação de carboidratos, a desnitrificação, e a hidrólise de amido e gelatina. Esses testes podem ser realizados individualmente ou por meio de sistemas comerciais padronizados, como o API®, VITEK® ou BD BBL™, que oferecem uma abordagem automatizada e reprodutível para a identificação de um grande número de bactérias (Janda; Abbott, 2007).

Além de sua importância diagnóstica, a caracterização bioquímica também fornece informações relevantes sobre o potencial ecológico ou industrial dos isolados bacterianos. Por exemplo, bactérias com atividade celulolítica ou proteolítica podem ser exploradas na biorremediação ou na indústria alimentícia. Embora métodos moleculares tenham ganhado espaço nos últimos anos, a análise bioquímica



continua a ser uma etapa valiosa e complementar na microbiologia aplicada (Tortora *et al.*, 2020).

Observações gerais que devem estar presentes incluem utilizar controlos positivos e negativos em todos os testes, manter condições assépticas durante todo o procedimento, e comparar resultados com chaves bacterianas como o Bergey's Manual ou testes comerciais como API™ e Biolog™.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Papel de filtro	H ₂ O ₂ 3% (v/v)
Tubos de Durham	N,N,N,N-tetrametil- <i>p</i> -fenilenodiamina (TMPD)
Tubos de ensaio	Glucose
Micropipeta de 5000 µL	Manitol
Ponteiras de 5000 µL (brancas)	Meio TSI (<i>Triple Sugar Iron</i>)
Espectrofotómetro UV-Vis	Reagente de Kovacs
Espátulas de inox	Meio Christensen
Centrífuga	Ágar Citrato de Simmons
Tubos de centrífuga	Meio TSI (Tripla Açúcar e Ferro)
Vórtex	Meio de Voges-Proskauer
Banho-maria	Meio Vermelho de Metila
Luz UV	Metanol
	Etanol
	Plasma de coelho Bioclin©



Procedimento experimental

a) Teste da catalase

a1) Adicionar H_2O_2 3% (v/v) sobre a colônia. O desenvolvimento de bolhas indica reação positiva.

b) Teste da oxidase

b1) Aplicar reagente (N,N,N,N-tetrametil-*p*-fenilenedi-
amina (TMPD)) **bp-5.2-1**, em papel de filtro.
Desenvolvimento de coloração púrpura em 30 s
indica resultado positivo.


c) Fermentação de Açúcares: glucose, manitol

c1) Inocular tubos com caldo + açúcar e indicador.
Incubar durante 24-48 h.

c2) Mudança para amarelo (ácido) e presença de gás
(tubo de Durham). **bp-5.2-2**

d) Produção de H_2S

d1) Inocular meio TSI (*Triple Sugar Iron*, utilizado para a
diferenciação de bactérias com base em suas
capacidades de fermentar glicose, lactose e/ou
sacarose, além de detectar a produção de sulfureto



de hidrogênio (H₂S)). Formação de precipitado preto indica produção de H₂S.

e) Teste do indol


e1) Adicionar reagente de Kovacs. A formação de um anel vermelho indica resultado positivo. **bp-5.2-3**

f) Teste da urease

f1) Inocular meio Christensen (ou agar Ureia Base, é um meio de cultura seletivo usado em microbiologia para diferenciar bactérias, especialmente enterobactérias, pela sua capacidade de produzir a enzima urease, que hidrolisa a ureia, alterando o pH e a cor do meio de laranja para rosa, sendo fundamental para identificar gêneros como o *Proteus*). Desenvolvimento de cor rosa/roxo indica resultado positivo.

g) Teste do citrato

g1) Inocular meio Simmons (refere-se ao ágar Citrato de Simmons, meio de cultura diferencial usado em microbiologia para identificar bactérias (principalmente bacilos Gram-negativo) que




conseguem usar o citrato como única fonte de carbono e energia, mudando a cor do meio de verde para azul). Formação de cor azul indica uso de citrato.

h) Gás no meio TSI


h1) No teste TSI (Triplo Açúcar e Ferro), a produção de gás pela bactéria é um indicador crucial de sua capacidade de fermentar açúcares (glicose, lactose, sacarose), sendo visualizada como a formação de bolhas, rachaduras ou um deslocamento do ágar no fundo do tubo de ensaio, ajudando a diferenciar bactérias entéricas como *E. coli*, que produzem gás, de outras como *Salmonella*.^{bp-5.2-4} A formação de deslocamento/rachaduras no meio indica resultado positivo.

i) Testes adicionais (opcional)

i1) VP, MR, Redução de nitrato, Descarboxilação de aminoácidos. Estes quatro testes (Voges-Proskauer, Vermelho de Metila, Redução de Nitrato e Descarboxilação de Aminoácidos) são provas bioquímicas fundamentais utilizadas na microbiologia




para a identificação e diferenciação de bactérias, especialmente bacilos Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*. **Voges-Proskauer (VP):** Visa determinar se a bactéria utiliza a via butileno-glicol para fermentar a glicose, produzindo acetilmetilcarbinol (acetoína) como produto intermediário neutro (resultado positivo: cor rosa-avermelhada ou carmesim (presença de acetoína); resultado negativo: amarelo/castanho (ausência de acetoína)). Geralmente, bactérias que dão teste VP positivo são VM negativas, e vice-versa. **Vermelho de Metila (VM/MR - Methyl Red):** Visa determinar se a bactéria realiza fermentação ácido-mista, produzindo ácidos estáveis (como ácidos láctico, acético e fórmico) a partir da glicose, o que reduz o pH do meio para cerca de 4.4 ou menos (resultado positivo: vermelho (pH baixo/ácido); resultado negativo: amarelo (pH alto/neutro)). **Redução de Nitrato:** Visa verificar a capacidade da bactéria de produzir a enzima nitrato-redutase, que reduz o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) na respiração anaeróbica (resultado



positivo: desenvolvimento de cor vermelha (nitrito foi reduzido a nitrito); resultado negativo: sem cor após reagentes (se ao adicionar pó de zinco ficar vermelho, é negativo (zinco reduziu), se continuar incolor, é positivo (nitrito foi reduzido a nitrogênio gasoso ou amônia))). **Descarboxilação de aminoácidos:** Visa identificar se a bactéria produz enzimas descarboxilases (como lisina-, ornitina- ou arginina-descarboxilase), que removem o grupo carboxilo (COOH) dos aminoácidos, gerando aminas alcalinas e CO₂. A alcalinização do meio (aumento do pH) devido à produção de aminas muda a cor do indicador de pH (púrpura de bromocresol) de amarelo (ácido, fermentação de glicose) para roxo/púrpura (alcalino, teste positivo).


j) Produção de pigmentos: xantomadina

j1) Xantomadina é um termo utilizado para designar uma classe de compostos secundários produzidos por algumas espécies do gênero *Xanthomonas*, estando especialmente associados a algumas bactérias



fitopatogênicas; esses compostos têm sido estudados devido ao seu papel no processo de fitopatogenicidade.

- j2)** Cultivar as colônias de *Xanthomonas* em meio de cultura sólido (NA ou YDC) em placas de Petri, a 28-30 °C, por 48 a 72 h, com as colônias a apresentarem coloração amarelada, o que indicaria a produção de xantomonadina.
- j3) Coleta de biomassa:** raspagem das colônias bacterianas da superfície do meio de cultura com uma espátula estéril, transferência da biomassa bacteriana para tubos de centrífuga e centrifugação a 10,000 rpm por 10-15 min para sedimentar as células, descartando o sobrenadante e retendo o *pellet* bacteriano.
- j4) Extração com metanol:** adicionar metanol suficiente para cobrir completamente o *pellet* bacteriano (aproximadamente 3-5 mL de metanol por tubo), agitando em vórtex por aproximadamente 30 s para suspender bem as células no metanol, incubar o tubo em banho-maria aquecido a 55-60 °C por 10-15 min



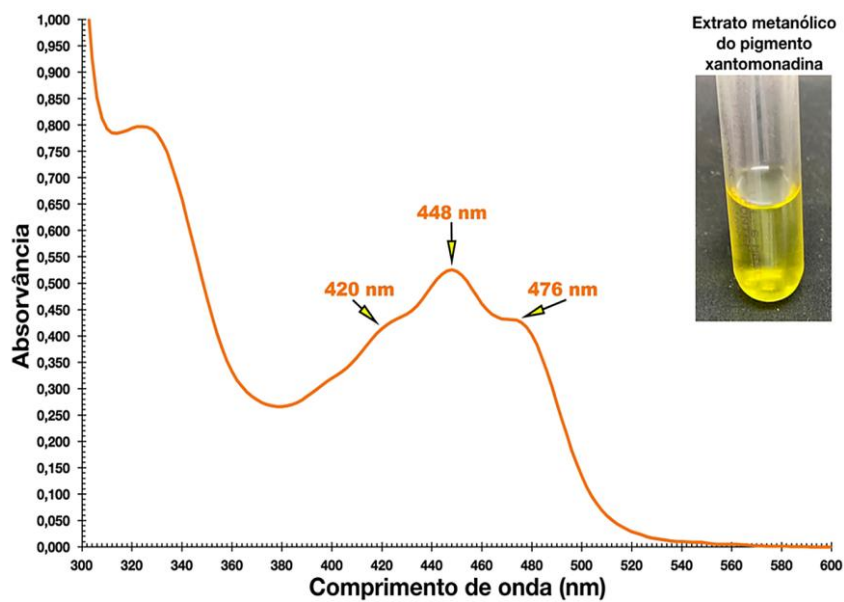
com agitação ocasional (o calor facilita a extração de pigmentos carotenóides (xantomonadina) da membrana celular bacteriana e, após a incubação, a mistura deverá apresentar uma coloração amarela, indicando a presença de xantomonadina).

j5) Separação de pigmentos: centrifugar a suspensão a 10,000 rpm por 10–15 min para separar os restos celulares do extrato líquido, coletar o sobrenadante (contendo a xantomonadina dissolvida em metanol) e descartar o *pellet*.

j6) Análise espectrofotométrica: transferir uma alíquota do extrato filtrado para uma cubeta de quartzo, e medir a absorbância realizando uma varredura espectral UV-Vis na faixa espectral de comprimentos de onda de 350-500 nm (faixa característica da xantomonadina).

j6a) A varredura espectral UV-Vis do extrato metanólico de xantomonadina deverá produzir o seguinte resultado (Figura 11).

Figura 11 — Varredura espectral UV-Vis característica do extrato metanólico de xantomonadina



Fonte: elaborada por Victor Balcão

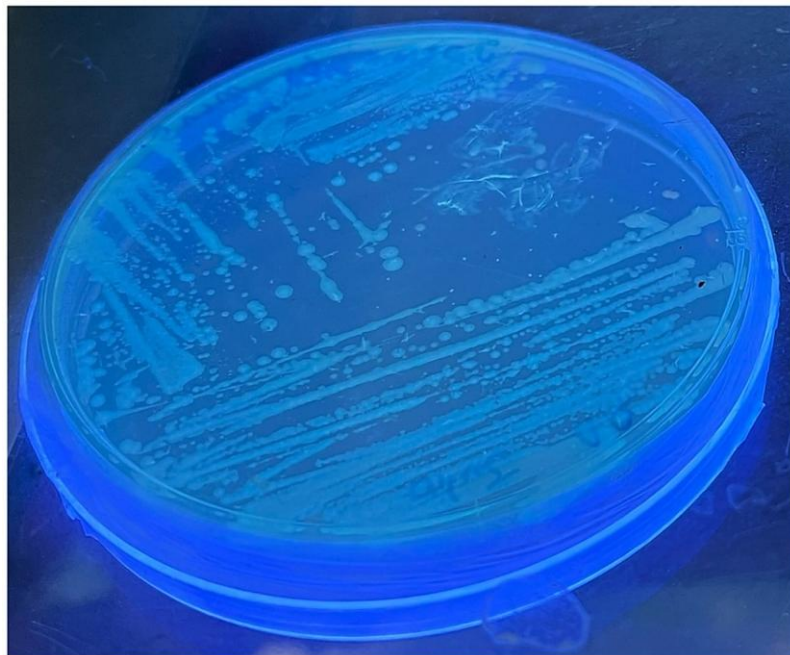


k) Produção de pigmentos: pioverdina e piocianina

k1) Piocianina e pioverdina são pigmentos produzidos principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, cada um com funções distintas: a **pioverdina** é um sideróforo (quelante de ferro) fluorescente verde-amarelado essencial para a bactéria obter ferro (crucial para o metabolismo bacteriano) em ambientes pobres, formação de biofilmes e virulência, enquanto a **piocianina** é um pigmento azulado com atividade redox, que causa dano tecidual e suprime a imunidade tendo papel na formação de biofilmes. Ambos os pigmentos são importantes na patogênese da infecção pela bactéria. Emitem um brilho verde-amarelado ou azulado sob luz UV devido a um cromóforo de quinolina, o que facilita sua detecção e estudo.

k2) A visualização do pigmento fluorescente por aplicação de luz ultravioleta deverá produzir o seguinte resultado (Figura 12):

Figura 12 — Fluorescência sob luz UV característica dos pigmentos piocianina/pioverdina



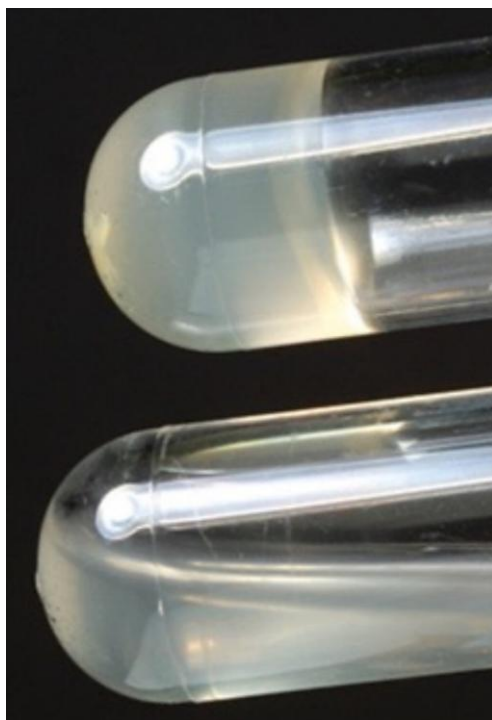
Fonte: elaborada por Alessandro Santos

I) Teste da coagulase

I1) Este teste é uma das várias características bioquímicas que ajudam a identificar e diferenciar *Xanthomonas* de outros gêneros bacterianos em laboratório, uma vez que *Xanthomonas* não produz a enzima coagulase, portanto, não causa coagulação plasmática.

- 12)** Adicionar plasma de coelho Bioclin© a um tubo de ensaio e em seguida transferir colônias das bactérias isoladas para o mesmo tubo, com homogeneização, observando-se a presença ou não de coagulação da amostra.
- 13)** O teste da coagulase deverá produzir o seguinte resultado (Figura 13):

Figura 13 — Resultados característicos do teste da coagulase (cima: resultado positivo; baixo: resultado negativo)



Fonte: elaborada por Alessandro Santos



5.3 Caracterização genômica

A caracterização genômica bacteriana representa uma abordagem avançada e precisa na identificação e análise de microrganismos, permitindo uma compreensão detalhada de sua diversidade genética, capacidade metabólica e potencial patogênico. Com o advento das técnicas de biologia molecular, como a amplificação do gene 16S rRNA, a genotipagem por PCR e o sequenciamento de nova geração (NGS), tornou-se possível explorar o genoma bacteriano com alta resolução, ultrapassando as limitações dos métodos fenotípicos e bioquímicos tradicionais (Janda; Abbott, 2007; Madigan *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022).

A análise do gene 16S rRNA é particularmente útil para a identificação taxonômica, dado seu elevado grau de conservação entre diferentes espécies bacterianas e sua capacidade de discriminar grupos filogenéticos (Clarridge, 2004). Por outro lado, o sequenciamento genômico completo tem permitido não apenas a classificação precisa, mas também a predição de funções gênicas, resistência antimicrobiana e virulência, sendo uma ferramenta



indispensável em estudos de ecologia microbiana, saúde pública e biotecnologia (Franzosa *et al.*, 2014).

Além de sua robustez na identificação, a caracterização genômica é essencial para a vigilância epidemiológica e para a seleção de cepas bacterianas com características desejáveis em aplicações industriais e ambientais. À medida que os custos de sequenciamento continuam a diminuir, espera-se que essas abordagens se tornem cada vez mais acessíveis em laboratórios de pesquisa e diagnóstico (Quainoo *et al.*, 2017).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Kit para extração de DNA bacteriano
Cubetas de quartzo	Primers universais 27F/1492R
Micropipeta de 1000 μL	
Micropipeta de 5000 μL	
Ponteiras de 1000 μL (azuis) e 5000 μL (brancas)	
Electroforese em gel de agarose	

Procedimento experimental


- a)** Extração de DNA genômico total por método fenol-clorofórmio ou kits comerciais.
- b)** Amplificação do gene 16S rRNA por PCR (primers universais 27F/1492R).
- c)** Electroforese em gel de agarose para verificação do produto.
- d)** Sequenciamento e comparação com banco de dados NCBI (BLAST) ou SILVA.
- e)** Análise filogenética para confirmação de identificação.



6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

O isolamento bacteriano constitui uma etapa crítica para o diagnóstico fitopatológico. Esse processo envolve a transferência, sob condições assépticas, de microrganismos presentes em tecidos vegetais sintomáticos para meios de cultura artificiais, com o objetivo de isolar o patógeno em sua forma viável, separando-o de contaminantes e da microbiota associada. A obtenção de colônias puras é indispensável para qualquer investigação subsequente de patogenicidade e identificação.

Nesta etapa é fundamental associar a literatura científica disponível com o quadro sintomatológico observado nas plantas, listando os possíveis agentes causais e suas requisições de crescimento, sendo o diagnóstico final ou a identificação feita pela investigação/exclusão daqueles que temos certeza que não apresentam determinadas




características. Os testes moleculares realizados posteriormente deverão confirmar o agente causal.

A identificação fundamentada em características morfológicas e culturais, mesmo que limitada, oferece orientações úteis nos estágios iniciais do trabalho. Além disso, a preservação adequada dos isolados bacterianos garante sua disponibilidade para estudos complementares ou reavaliações futuras, algo particularmente importante em projetos de médio e longo prazo, como os que envolvem o isolamento e caracterização de bacteriófagos visando o controle biológico.

Este capítulo apresenta os principais procedimentos e protocolos relacionados ao isolamento, triagem e identificação de bactérias fitopatogênicas das hospedeiras mais estudadas atualmente no VBLab (Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso).

6.1 Coleta e preparação das amostras

A amostragem adequada é o primeiro passo para o sucesso do isolamento bacteriano. Devem-se selecionar plantas com sintomas típicos, preferencialmente em estágios




iniciais da doença. Amostras muito deterioradas ou contaminadas tendem a favorecer o crescimento de bactérias saprofíticas e dificultam a recuperação do patógeno.

6.2 Meios de cultura mais utilizados

A escolha do meio de cultura é uma etapa fundamental no isolamento e na caracterização de bactérias fitopatogênicas, influenciando diretamente a recuperação dos isolados e a expressão de características fenotípicas relevantes. Não há meios de cultura universais, e sua seleção deve considerar a bactéria suspeita, o material de origem e o objetivo do ensaio. Os procedimentos descritos neste capítulo devem ser utilizados como referência, sendo imprescindível a consulta às descrições originais e aos trabalhos posteriores que propuseram ajustes e aprimoramentos dos protocolos.

Os meios de cultura mais utilizados incluem:

- Ágar Nutriente (NA) - meio geral para isolamento de diversas espécies, incluindo *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pectobacterium*, *Dickeya* e *Erwinia*, entre outras




espécies de importância agrícola; Algumas modificações podem ser atribuídas, como a adição de sacarose (NAS);

- Ágar King's B (KB) - indicado para identificação de *Pseudomonas* spp., favorece a produção de pigmentos fluorescentes;
- Meio YDC (Yeast Dextrose Calcium carbonate) - útil para *Xanthomonas*;
- Meio 523 - especialmente recomendado para isolados de tecidos vasculares, como *Ralstonia*.

6.3 Confirmação preliminar da presença de bactéria fitopatogênica, isolamento e obtenção de colônias puras

A confirmação preliminar da natureza bacteriana dos sintomas, seguida do isolamento e da obtenção de colônias puras permitem estabelecer a associação inicial entre o microrganismo e o tecido vegetal afetado, além de fornecer material biológico adequado para análises posteriores. Ressalta-se que as metodologias de detecção e isolamento podem variar conforme o patossistema, o estado fisiológico do hospedeiro e a população bacteriana presente, sendo indispensável à consulta à literatura científica e aos



protocolos clássicos e revisados, para assegurar maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

a) Teste de exsudação em gota e métodos de isolamento.

O teste de exsudação é utilizado como triagem preliminar para detectar a presença de bactérias fitopatogênicas nos tecidos vegetais com sintomas recentes. Baseia-se na extrusão de células bacterianas para um meio aquoso, permitindo a visualização direta ao microscópio óptico.


a1) Teste de exsudação em gota.

a1.1) Seleciona-se tecido vegetal contendo lesões ativas, preferencialmente na zona de transição entre tecido sadio e lesionado.

a1.2) Recorta-se um pequeno fragmento (~0,5 cm) com auxílio de bisturi ou tesoura estéril.

a1.3) O fragmento é transferido para uma lâmina de microscopia contendo uma gota de água destilada estéril.

a1.4) Cobre-se com lamínula, evitando formação de bolhas.




a1.5) A preparação é examinada ao microscópio óptico, iniciando-se com objetiva de 10x. Recomenda-se abaixar o condensador e ajustar o diafragma para maior contraste.

a1.6) Observa-se a presença de massa celular densa extravasando do tecido vegetal. Agregados bacterianos aderidos à borda da lesão indicam provável infecção por fitobactérias.

a1.7) Em infecções bacterianas, as células permanecem agrupadas no meio aquoso. Já em contaminações por saprófitas, as células tendem a se dispersar rapidamente.

A ausência de exsudato não exclui a presença de bactéria, podendo estar relacionada à fase da infecção, ao tecido seco ou à baixa população bacteriana. Esse teste é indicado antes do isolamento em meio de cultura e pode orientar a continuidade do diagnóstico fitobacteriológico.



a2) O método de isolamento depende do tipo de tecido vegetal e da localização do patógeno (epifítico, endofítico ou vascular). Duas abordagens principais podem ser utilizadas:

a2.1) Isolamento direto.

a2.1.1) Realiza-se a limpeza superficial do órgão vegetal com água e detergente neutro. Em alternativa, a superfície é desinfestada com álcool 70% (v/v) por 30 s, posteriormente em hipoclorito a 1% (v/v) por 30 s, e enxaguada 3x com água desionizada estéril.

a2.1.2) Pequenos fragmentos da região sintomática, preferencialmente aqueles utilizados no teste de exsudação em gota, são macerados em água destilada autoclavada, solução salina (NaCl 0,85% (m/v)) ou tampão fosfato (PBS), em ambiente estéril.

a2.1.3) A suspensão obtida é estriada por esgotamento em meio sólido (ex: NA, King's B, 523) utilizando alça em aro ou micropipeta



estéril, neste caso prosseguir com o espalhamento com alça de Drigalski.


a.2.1.4) As placas são incubadas a 28°C por 24 a 72 horas, dependendo do patógeno suspeito.

a2.2) Isolamento indireto.

a2.2.1) Após a desinfestação, fragmentos internos da planta são inoculados em plantas hospedeiras sadias (teste de patogenicidade). A forma de inoculação depende do patossistema em questão.

a2.2.2) Com o reaparecimento dos sintomas, realiza-se novo isolamento a partir das áreas infectadas, conforme descrito no método direto.

a2.2.3) Alternativamente, pode-se realizar incubação dos tecidos em câmara úmida por 24 h e coletar o exsudato bacteriano.



b) Obtenção de colônias puras. Após o crescimento inicial, é comum o aparecimento de colônias morfológicamente distintas na mesma placa. As colônias predominantes (geralmente homogêneas em tamanho, cor e forma) são candidatas prováveis ao agente patogênico (lembre-se da listagem dos prováveis agentes causais).


b1) Para obter colônias puras:

b1.1) Seleciona-se uma colônia isolada e íntegra com auxílio de uma alça estéril.

b1.2) Realiza-se novo estriamento em meio fresco, preferencialmente com formulação semelhante à do isolamento primário.

b1.3) Após incubação, a homogeneidade do crescimento deve ser avaliada; a presença de colônias únicas com morfologia uniforme indica pureza.


b1.4) Essa cultura é mantida sob refrigeração ou em tubos inclinados para posteriores testes bioquímicos e moleculares.



6.4 Testes de patogenicidade: reação de hipersensibilidade e inoculação em hospedeiro

Os testes de patogenicidade são fundamentais para avaliar a capacidade do isolado bacteriano em provocar sintomas em plantas, constituindo uma etapa prática de verificação da relação patógeno-hospedeiro. Esses ensaios requerem atenção às condições experimentais e interpretação cuidadosa dos resultados, uma vez que respostas negativas ou atípicas podem refletir limitações do método e não, necessariamente, ausência de patogenicidade. Por isso, a adaptação dos testes à realidade de cada patossistema e a experiência do pesquisador são tão importantes quanto o protocolo em si.


a) Reação de hipersensibilidade (HR). Este teste é baseado na resposta imune de plantas não hospedeiras à presença de patógenos com sistema de secreção tipo III (T3SS, *type-3 secretion system*), apesar de que, algumas espécies de bactérias ausentes desse sistema podem induzir HR. A inoculação de uma suspensão bacteriana ($\sim 10^8$ UFC/mL, produzida a partir de colônias com até 48 h de crescimento)



é feita em plantas indicadoras no qual folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) são as mais utilizadas e, promovem necrose localizada em até 24-36 h se o isolado for patogênico. Outras plantas indicadoras comumente utilizadas para o teste de HR são: tomateiro, feijoeiro, girassol, entre outras.

- a1)** A suspensão bacteriana é infiltrada no mesófilo com seringa sem agulha.
- a2)** A área infiltrada deve mostrar escurecimento tecidual (necrose) em 12-24 h.
- a3)** A ausência de HR não descarta a patogenicidade, mas indica a necessidade de outro teste.

b) Teste de patogenicidade em hospedeiro. Para confirmação do agente causal, a bactéria isolada deve ser inoculada em plantas sadias da espécie hospedeira original (ou compatível). O reaparecimento dos sintomas originais e o reisolamento do mesmo microrganismo constituem a confirmação de Koch, critério essencial na fitopatologia. O método de inoculação a ser escolhido deve ser compatível com o patossistema estudado. Por exemplo, a inoculação de pseudomonadáceas em folhas de cafeeiros é realizada com




sucesso pelo método de abrasão com lixa embebida em inóculo bacteriano (Silva *et al.*, 2025).

- b1)** Prepara-se suspensão bacteriana padrão ($\sim 10^6$ a 10^8 UFC/mL).
- b2)** Inocula-se em folhas, caules ou frutos sadios, dependendo do sintoma natural. Evitar inoculações por infiltração no tecido por causar sintomas muito agressivos.
- b3)** Observa-se o aparecimento de sintomas específicos no período típico de incubação (geralmente 2-10 dias).
- b4)** Realiza-se novo isolamento do agente a partir das lesões induzidas, comparando-o ao isolado original.

6.5 Identificação preliminar

Após o isolamento e confirmação da patogenicidade, realiza-se a identificação preliminar do isolado bacteriano. Essa etapa é essencial para direcionar corretamente os ensaios moleculares e definir estratégias de identificação. A identificação baseia-se na integração de dados culturais, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. A seguir, são descritos os critérios aplicáveis aos principais gêneros bacterianos fitopatogênicos estudados no VBLab (Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso).



a) Características culturais. A observação das colônias bacterianas em meios sólidos fornece indicações valiosas para a triagem inicial. Abaixo, algumas características típicas:


a1) *Xanthomonas* spp. - colônias mucóides, circulares, de coloração amarela intensa devido à produção de xantomonadina; crescimento lento a moderado; em YDC, colônias brilhantes e convexas.

a2) *Pseudomonas* spp. - colônias lisas, circulares, bordos irregulares, translúcidas; frequentemente fluorescentes sob luz UV em meio King's B; crescimento rápido.

a3) *Ralstonia solanacearum* - colônias fluidas, de aspecto leitoso em meio TZC; estirpes avirulentas exibem coloração avermelhada no centro.

a4) *Clavibacter michiganensis* - colônias circulares, pequenas e secas, opacas, alaranjadas ou amareladas, não mucoides; crescimento lento; Gram-positivo.

a5) *Erwinia* e *Pectobacterium* e espécies correlatas - colônias esbranquiçadas ou translúcidas, com odor




característico; crescimento rápido; causam podridão mole.

a6) *Xylella fastidiosa* - crescimento muito lento (10 a 30 dias) em meios como PWG ou PD2; colônias pequenas, circulares, opacas.

a7) *Curtobacterium flaccumfaciens* - colônias pigmentadas (amarelas, alaranjadas ou róseas), secas, podendo apresentar fosforescência leve; Gram-positivo.

a8) *Burkholderia/Robbsia* e espécies correlatas - colônias variáveis; geralmente não fluorescentes; podem apresentar odor terroso; crescimento moderado a rápido.

b) Coloração de Gram. Este teste distingue bactérias com base na estrutura da parede celular. Bactérias Gram-positivo coram-se em roxo (ex: *Clavibacter*, *Curtobacterium*), enquanto as Gram-negativo aparecem em rosa (ex: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*). Recomenda-se incluir



controles positivos (Gram + e Gram -) na lâmina para assegurar a validade da reação.

c) Testes bioquímicos simples.

c1) Catalase: positiva para a maioria das fitobactérias (exceto *Streptomyces*).

c2) Oxidase: positiva em *Pseudomonas*, negativa em *Xanthomonas* e *Ralstonia*.

c3) Teste do KOH (3%): viscosidade indica Gram-negativo.

c4) Hidrólise de esculina: pode ajudar a diferenciar espécies de *Pectobacterium*.

c5) Fermentação de glicose: positiva em *Erwinia*, *Pectobacterium*; negativa em *Pseudomonas*.


d) Diferenciação por HR (reação de hipersensibilidade).

Apenas presuntiva. Muitas espécies fitopatogênicas Gram-negativo provocam necrose rápida em folhas de tabaco quando infiltradas com suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL). Bactérias que não provocam HR incluem *Clavibacter*, *Xylella* e *Rhizobium*.



e) Padrões de utilização de meios seletivos.

- e1)** *Xanthomonas citri* – meio XCSM (*Xanthomonas Citri Selective Medium*) ou meio YDC (*Yeast Extract-Dextrose-Calcium Carbonate*).
- e2)** *Pseudomonas* – meio King's B (fluorescência, mas não é regra).
- e3)** *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* - meio SMSA (*Selective Medium South Africa*) ou meio TZC (ou Meio de Kelman, a designação TZC deriva do componente principal de diagnóstico, o corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio).
- e4)** *Xylella fastidiosa* – meio PD2 (*Pierce's Disease medium 2*), meio PWG (*Periwinkle Wilt Gelrite*).
- e5)** *Curtobacterium* - cresce bem em meio NA (agar nutriente); colônias pigmentadas.
- e6)** *Clavibacter michiganensis* – meio TSA (*Tryptic Soy Agar*, Ágar Triptona de Soja), meio YDC (*Yeast Extract-Dextrose-Calcium Carbonate*).




f) Interpretação integrada. A combinação de coloração de Gram, testes bioquímicos, sintomas observados em plantas hospedeiras, resposta HR e características culturais permite restringir consideravelmente as possibilidades diagnósticas. Embora não permita a identificação definitiva, essa abordagem orienta com precisão a seleção de primers ou anticorpos específicos em testes moleculares ou sorológicos posteriores. A partir da cultura pura e confirmada como patogênica, podem ser aplicadas técnicas de triagem para identificação ao nível de gênero ou espécie presumível.

f1) Características culturais: coloração, mucoidade, pigmentação, fluorescência, tempo de crescimento. Coloração de Gram: definição morfológica e estrutura da parede celular.

f2) Testes bioquímicos rápidos: catalase, oxidase, KOH, hidrólise de esculina, fermentação de glicose, entre outros.

f3) HR em diferentes plantas-teste: pode ajudar a discriminar espécies com espectros de hospedeiro distintos.



Essas informações, integradas à sintomatologia e dados epidemiológicos, permitem inferir o provável gênero bacteriano, facilitando a decisão sobre testes mais específicos, como sorologia ou PCR.

6.6 Chave para identificação preliminar de bactérias fitopato-gênicas

Esta chave dicotômica foi elaborada com base em características morfológicas, bioquímicas e culturais das principais bactérias fitopatogênicas descritas na literatura e observadas em culturas de importância agrícola. Deve ser utilizada como ferramenta preliminar de triagem e orientação para a condução de testes específicos.


a) Chave geral para gêneros fitopatogênicos

1.	Bactéria Gram-positivo	2
1'	Bactéria Gram-negativo	5
2	Colônias alaranjadas ou amareladas, secas, opacas; bastonetes em forma de clava; causam cancro ou murcha em tomateiro	<i>Clavibacter</i>
2'	Colônias pigmentadas, secas ou umedecidas, coloração variável	3
3	Colônias secas, rugosas, amareladas ou róseas; bastonetes pequenos; causam murcha do feijoeiro	<i>Curtobacterium</i>
3'	Colônias opacas ou cerosas; forma filamentosa, presença de esporos	4
4	Crescimento filamentoso, esporos em cadeias; patógeno de batata (sarna)	<i>Streptomyces</i>
4'	Colônias mucoides ou irregulares, presença em plantas leitosa ou ornamentais	<i>Rhodococcus</i>
5	Oxidase positiva	6
5'	Oxidase negativa	9
6	Produz fluorescência em meio King's B; colônias lisas, brancas; manchas foliares, HR positiva	<i>Pseudomonas</i>
6'	Não fluorescente; colônias variáveis, exsudatos fortes ou escuros	7
7	Colônias leitosas, fluidas; centro rosado em meio TZC; HR variável; murcha vascular intensa	<i>Ralstonia</i>
7'	Colônias opacas ou mucoides; não pigmentadas, sem fluorescência	8
8	Colônias grandes, sem pigmento; HR negativa ou fraca; causam necrose em goiabeira	<i>Erwinia</i>
8'	Crescimento lento; colônias translúcidas, sem odor forte; coloniza xilema	<i>Xylella</i>
9	Produz colônia amarela intensa em YDC; muco abundante; HR positivo (depende da planta teste)	<i>Xanthomonas</i>
9'	Produz colônia branca ou transparente; HR negativa; degrada pectinas; podridões moles	<i>Pectobacterium</i> ou <i>Dickeya</i>




6.7 Identificação molecular de bactérias fitopatogênicas

A identificação molecular de bactérias fitopatogênicas tem avançado de forma expressiva nas últimas décadas, impulsionada pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e pela expansão das abordagens genômicas. Métodos de alta resolução, como o sequenciamento de nova geração, a PCR em tempo real, LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification, método molecular rápido e sensível para amplificar sequências específicas de DNA ou RNA, funcionando em uma única temperatura constante, sem a necessidade de termocicladores como a PCR) e plataformas portáteis baseadas em biossensores, já possibilitam diagnósticos extremamente rápidos, sensíveis e adaptáveis a diferentes contextos de campo e laboratório. Ainda assim, nos ambientes de rotina (especialmente em instituições de ensino, laboratórios didáticos e centros de diagnóstico agrícola) a PCR convencional com *primers* específicos permanece como a ferramenta mais acessível, robusta e confiável para a detecção direcionada de agentes etiológicos.



Essa estratégia permite a amplificação seletiva de regiões genômicas que distinguem gêneros, espécies e patovares de alta relevância agrônômica, incluindo *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, entre todos os outros patógenos que compõem parte significativa das fitobacterioses observadas no Brasil. É importante enfatizar que protocolos publicados podem apresentar variações no desenho dos *primers*, nas condições de termociclagem e nos critérios de interpretação dos produtos amplificados. Por isso, a consulta rigorosa às fontes originais é indispensável para assegurar precisão diagnóstica e fidelidade à especificidade biológica descrita na literatura.

Apresenta-se a seguir, uma seleção de *primers* utilizados para a detecção de patógenos que acometem culturas de grande importância nacional (como citrinos, café, maracujá, mandioca, brássicas, feijoeiro e tomateiro) além de *P. syringae* pv. *syringae*, notória por sua extensa gama de hospedeiros. Este conjunto representa uma base sólida de referência, embora não esgote a diversidade de marcadores disponíveis. O campo da fitobacteriologia é dinâmico e continuamente alimentado por novos protocolos, novos



alvos genômicos e revisões metodológicas que ampliam a confiabilidade dos diagnósticos. Assim, reconhecendo a natureza evolutiva do conhecimento científico, incentivamos que pesquisadores e profissionais consultem regularmente a literatura especializada e atualizem suas práticas laboratoriais, fortalecendo a precisão, a autonomia e o pensamento crítico ao longo do processo diagnóstico.

Tabela 1 - Marcadores moleculares e *primers* diagnósticos para identificação rápida de fitobactérias de relevância

Bactéria (espécie / patovar)	Nome do Primer	Sequência 5' → 3'	Tamanho esperado do amplicon (bp) / Observações	Ref.
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Xac01	CGC CAT CCC CAC CAC CAC GAC	581	Coletta-Filho <i>et al.</i> (2006)
	Xac02	AAC CGC TCA ATG CCA TCC ACT TCA		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Pas-R	CAC AGC TGC CAT GAT GAG	1000	Gonçalves; Rosato (2002)
	Pas-D	CAC AGC TGC CGA AAG AAG		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	RS-F-759	GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC	281	Opina <i>et al.</i> (1997)
	RS-R-760	GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG		
<i>Pseudomonas coronafaciens</i> pv. <i>garcae</i>	REPIR-I	III ICG ICG ICA TCI GGC	<i>Fingerprint</i> multibandas, utilizar linhagens-tipo para a confirmação	Louws <i>et al.</i> (1994)
	REP-2I	ICG ICT TAT CIG GCC TAC		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Xam-F	GCG TTG CGT TTT CCG TCG	898	Verdier <i>et al.</i> (1998)
	Xam-R	CGC GCC GTT GAT GTT GAG		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Xcc-F	CGT CAG TGC GAG TTC GAG	525	Park <i>et al.</i> (2004)
	Xcc-R	GTC GTC GAT GAT GTC GAT		


Lista de *primers* específicos descritos na literatura para detecção por PCR convencional de bactérias fitopatogênicas de ocorrência frequente em importantes culturas agrícolas. Estão indicadas as sequências oligonucleotídicas, o tamanho esperado dos amplicons e as respectivas referências originais, cuja consulta é essencial para reprodutibilidade e padronização metodológica.

6.8 Identificação de bacterioses não fastidiosas do cafeeiro

A mancha-aureolada do cafeeiro (*Coffea* spp.), causada por *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, é uma doença bacteriana de ocorrência relevante em regiões cafeeiras de clima ameno. Registrada inicialmente em Garça (SP), em 1955, manteve-se com baixa importância econômica até os surtos observados nas décadas de 1970 e 1980. Atualmente, sua incidência é favorecida por fatores abióticos como geadas, ventos frios e práticas de poda, sendo frequente em viveiros e lavouras em formação.

A sintomatologia típica, caracterizada por manchas necróticas foliares com ou sem halo clorótico, pode ser confundida com lesões provocadas por fungos como *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda*, ou por outras bactérias fitopatogênicas, descritas a seguir.

As principais espécies são: *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, *P. amygdali* pv. *tabaci*, *P. cichorii* e *Robbsia andropogonis*, as quais provocam sintomas similares, exigindo um conjunto de testes laboratoriais integrados para



sua diferenciação. Apresenta-se de seguida uma sequência de procedimentos práticos para isolar, identificar e distinguir essas bactérias em contexto de ensino e diagnóstico. Cabe ressaltar que *P. coronafaciens* pv. *garcae* e *P. amygdali* pv. *tabaci*, agentes causais da mancha-aureolada e mancha-foliar-bacteriana, respectivamente, são as mais comumente encontradas.

a) Isolamento e obtenção de cultura pura. Seguir os mesmos passos descritos na seção 6.3 a 2.1:

- a1)** Amostragem de tecidos com sintomas típicos (manchas foliares, seca de ponteiros, necroses).
- a2)** Maceração em NaCl (0,85%, m/m) e semeadura em meios de cultura NA e King's B.
- a3)** Incubação a 28 °C por 48-72 h.
- a4)** Seleção de colônias predominantes para repicagem e purificação.

b) Triagem inicial e observação cultural. As principais diferenças fenotípicas nos meios de cultura são (Tabela 2):

Tabela 2 - Principais diferenças fenotípicas nos meios de cultura

Espécie bacteriana	Pigmentação (em meio de cultura King's B)	Coloração em meio NA	Crescimento	Observação
<i>P. coronafaciens</i> pv. <i>garcae</i>	Fluorescência fraca	Marrom (melanina)	Moderado	Bordas irregulares
<i>P. amygdali</i> pv. <i>tabaci</i>	Forte fluorescência	Clara	Rápido	Halo amarelado em tecidos
<i>P. cichorii</i>	Variável, fraca	Branca a creme	Rápido	Lesões negras, desfolha
<i>R. andropogonis</i>	Não fluorescente	Esbranquiçada	Rápido	Semelhante a <i>P. coronafaciens</i> pv. <i>garcae</i>

c) Testes diferenciais bioquímicos. Seguir a metodologia simplificada de testes bioquímicos com colônias puras (Tabela 3):

Tabela 3 - Resultados de testes bioquímicos com colônias puras

Teste	<i>P. coronafaciens pv. garcae</i>	<i>P. amygdali pv. tabaci</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>R. andropogonis</i>
Produção de levan	+	+	-	-
Oxidase	-	-	+	-
Florescência (King's B)	+ (fraca, esverdeada)	+ (forte, azulada)	+	-
Hipersensibilidade (HR – tabaco)	+	- (patogenicidade) testar HR em outra indicadora	+	-
Pigmento marrom (melanina) em meio NA	+	-	-	-
Produção de ácido a partir de:				
Adonitol	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	+
Sacarose	+	+	-	-
Sorbitol	+	+	-	+
Utilização de:				
L(+) Tartarato	-	+	nd	nd
Trigonelina	-	+	nd	nd

Legenda: + (positivo); - (negativo); nd (não determinado)

Outros testes podem ser úteis para a diferenciação das bacterioses, entretanto, como o foco do manual encontra-se na detecção da mancha-aureolada, os testes descritos poderão indicar os isolados desta espécie. A confirmação final será via testes moleculares.



6.9 Identificação de bacteriose do maracujazeiro


A bacteriose do maracujazeiro, provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, constitui a principal doença bacteriana da cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do Brasil. A doença afeta folhas, hastes e frutos, reduzindo o potencial fotossintético da planta, comprometendo a qualidade dos frutos e, em casos severos, levando à morte de plantas jovens, o que resulta em prejuízos econômicos significativos para o cultivo comercial.

A sintomatologia típica é caracterizada por lesões necróticas angulares, inicialmente encharcadas, frequentemente delimitadas por nervuras, podendo evoluir para queda prematura de folhas e aparecimento de lesões deprimidas em frutos, que se tornam suscetíveis à infecção secundária por patógenos oportunistas. Tais sintomas podem ser confundidos com danos abióticos ou com doenças fúngicas, o que exige diagnóstico diferencial criterioso. Apresentam-se na Tabela 4 as características

fenotípicas e bioquímicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.


Tabela 4 - Características fenotípicas e bioquímicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Teste	Resultado/Característica	Observação
Gram	Negativo	Bastonete Gram-negativo
Aerobiose	Obrigatória	Crescimento apenas sob condições aeróbias
Pigmentação (meio YDC)	Amarelo intenso	Produção de xantomonadina (teste descrito abaixo), característica do gênero
Mucoidade	Elevada	Exopolissacarídeos abundantes em meios sólidos
Oxidase	Negativa	Teste diferencial útil frente a <i>Pseudomonas</i>
Catalase	Positiva	Formação de bolhas em presença de H ₂ O ₂
Reação de Hipersensibilidade (HR)	Positiva	Necrose local em plantas não hospedeiras (ex.: tomateiro)
Meio seletivo	XCSM	Meio seletivo específico para isolamento de <i>Xanthomonas spp.</i>
Crescimento em meio YDC ou meio NA	Moderado a rápido	Colônias mucóides, brilhantes, de coloração amarela intensa
Confirmação molecular	Recomendada	PCR com primers específicos ou sequenciamento de 16S rRNA



A identificação de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* é facilitada por suas características fenotípicas e bioquímicas distintas. A produção de xantomonadina (Protocolo 5.2j, p. 83), pigmento amarelo específico do gênero *Xanthomonas*, representa um marcador confiável na triagem preliminar, especialmente quando associada à patogenicidade comprovada em maracujazeiro. A presença desse pigmento em isolados patogênicos permite uma identificação presuntiva consistente. Para confirmação definitiva e aumento da robustez diagnóstica, recomenda-se a aplicação de métodos moleculares específicos, como PCR com primers direcionados.

a) Extração e detecção de xantomonadina em isolados de *Xanthomonas*. A xantomonadina é um pigmento carotenóide hidrofóbico, de coloração amarela intensa, produzido exclusivamente por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Sua presença é considerada uma característica diagnóstica útil para triagem e identificação preliminar de isolados suspeitos. Abaixo, apresenta-se o



protocolo padronizado para extração e detecção desse pigmento em cultura pura.

a1) Cultivo para produção de pigmento.

a1.1) Inocular o isolado bacteriano em meio sólido adequado (preferencialmente NA ou YDC).

a1.2) Incubar a 28-30 °C por 48 a 72 h.

a1.3) Observar colônias de coloração amarela intensa, brilhantes e mucóides.

a2) Extração da xantomonadina.

a2.1) Com alça estéril, raspar abundantemente colônias de *Xanthomonas* e transferir para tubo de ensaio contendo 1 mL de etanol absoluto.

a2.2) Homogeneizar a suspensão por vortex por 1 min.

a2.3) Proteger o tubo da luz (envolver com papel alumínio) e incubar à temperatura ambiente por 30 min.



- a2.4)** Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min para separar o sedimento celular.
- a2.5)** Coletar o sobrenadante com micropipeta: a presença de coloração amarela intensa indica extração positiva de xantomonadina.
- a3)** Confirmação espectrofotométrica da xantomonadina.
 - a3.1)** Transferir cuidadosamente o sobrenadante etanólico obtido na etapa de extração para uma cubeta de quartzo previamente limpa, garantindo que não haja presença de partículas celulares residuais.
 - a3.2)** Realizar a varredura espectrofotométrica em espectrofotômetro UV-Vis, configurando o intervalo de varredura entre **350 e 500 nm**, com passo de leitura de 5 nm e branco constituído por etanol absoluto.
 - a3.3)** Registrar o espectro de absorvância. A presença de um pico máximo entre 440 e 445 nm indica fortemente a presença de xantomonadina,



com absorvância típica variando entre 0,2 e 1,2 unidades (dependendo da concentração bacteriana e eficiência da extração). Um pico secundário (menos intenso) será detectado em torno de 390-400 nm.


a3.4) Na Figura 11 pode encontrar-se uma varredura espectral UV-Vis característica do extrato etanólico de xantomonadina.



7 TRABALHANDO COM BACTÉRIAS: CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As chaves de identificação bacteriana são ferramentas essenciais para a classificação e identificação sistemática de microrganismos isolados, com base em características observáveis e mensuráveis. Essas chaves organizam os dados microbiológicos de forma lógica e hierárquica, geralmente em formato dicotômico, permitindo que o pesquisador siga um caminho decisório que culmina na identificação provável de um isolado bacteriano. A construção dessas chaves é fundamentada em características fenotípicas, bioquímicas e, mais recentemente, moleculares, que discriminam entre gêneros e espécies bacterianas com crescente precisão.

No contexto laboratorial, especialmente na microbiologia ambiental e clínica, o uso de chaves de identificação auxilia na organização dos resultados obtidos em testes como a coloração de Gram, morfologia celular, presença de estruturas específicas (como esporos ou



flagelos), perfil enzimático e capacidades metabólicas. Obras como o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005) representam marcos na sistematização de tais chaves, oferecendo orientações taxonômicas amplamente aceitas e atualizadas pela comunidade científica.

Com o avanço das técnicas moleculares e genômicas, as chaves de identificação modernas têm se integrado a bancos de dados digitais e sistemas automatizados, ampliando a robustez da análise microbiológica. Ainda assim, o domínio das chaves clássicas continua sendo fundamental para a formação acadêmica e prática de estudantes e profissionais de microbiologia, garantindo a correta interpretação dos resultados e a aplicação criteriosa das novas tecnologias disponíveis.


Este capítulo apresenta chaves de identificação bacteriana com base em testes fenotípicos e bioquímicos clássicos, permitindo a identificação preliminar de isolados bacterianos. As chaves (Tabela 5) seguem a lógica dicotômica e são baseadas em referências como o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005).

Tabela 5 - Chaves de identificação bacteriana com base em resultados de testes fenotípicos e bioquímicos clássicos

Chave 1: reação de Gram		
[1a]	Gram-positivo	Ir para Chave 2
[1b]	Gram-negativo	Ir para Chave 5
Chave 2: Gram-positivos		
[2a]	Catalase positiva	Ir para Chave 3
[2b]	Catalase negativa	<i>Streptococcus</i> spp. ou <i>Enterococcus</i> spp.
Chave 3: Bacilos Gram-positivo catalase positiva		
[3a]	Coagulase positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>
[3b]	Coagulase negativa	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ou outros
Chave 4: Bacilos Gram-positivo		
[4a]	Esporulados	<i>Bacillus</i> spp.
[4b]	Não esporulados	Ir para testes adicionais (ex. <i>Listeria</i> , <i>Corynebacterium</i>)
Chave 5: Gram-negativo		
[5a]	Oxidase positiva	Ir para Chave 6
[5b]	Oxidase negativa	Ir para Chave 7
Chave 6: Gram-negativo oxidase positiva		
[6a]	Bastonetes móveis, não fermentadores	<i>Pseudomonas</i> spp.
[6b]	Cocobacilos ou pleomórficos	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Alcaligenes</i> spp.
Chave 7: Enterobacteriaceae (oxidase negativa)		
[7a]	Produz H ₂ S	<i>Salmonella</i> spp. ou <i>Proteus</i> spp.
[7b]	Não produz H ₂ S	Ir para Chave 8
Chave 8: Enterobacteriaceae sem H₂S		
[8a]	Fermenta lactose	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.
[8b]	Não fermenta lactose	<i>Shigella</i> spp., <i>Serratia</i> spp.

Observações Finais

Estas chaves devem ser utilizadas em conjunto com resultados de testes bioquímicos, perfil de crescimento e características morfológicas. Para identificação precisa, recomenda-se o uso complementar de métodos moleculares



ou sistemas comerciais como API 20E® (sistema de testes bioquímicos usado para identificar bactérias Gram-negativo entéricas (como *E. coli*, *Salmonella*), que contém 20 testes miniatura em régua para analisar a atividade metabólica e produzir um perfil numérico para identificação), VITEK (linha de sistemas automatizados da BioMérieux para identificação e testes de suscetibilidade a antimicrobianos de organismos (bactérias, leveduras) em laboratórios clínicos e industriais, utilizando tecnologias como MALDI-TOF (VITEK MS) ou bioquímica (VITEK 2)) ou MALDI-TOF ((*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) é uma técnica de espectrometria de massa rápida e precisa usada principalmente em microbiologia para identificar organismos (bactérias, fungos) analisando seu perfil proteico ("impressão digital") de forma muito rápida, com um laser que ioniza as proteínas de uma amostra em uma matriz, separando-as pelo tempo que levam até chegar ao detector).

BIOPORQUÊS

bp-4.6-1	O inóculo da bactéria deve ser preparado em volume de 500 mL de meio TSB para que o volume total amostrado ao final da realização da curva de crescimento não exceda 10% (v/v) do volume inicial de cultura. Adicionalmente, o inóculo deve ser mantido em Erlenmeyer de 2000 mL de volume para que o O ₂ presente no <i>headspace</i> seja suficiente para as necessidades de crescimento da cultura.
bp-4.6-2	Densidade ótica não deve ser confundida com absorvância. Com a absorvância, os fótons são absorvidos e desaparecem do sistema, daí a lei de Beer-Lambert: absorvância ($\log I/I_0$) é estritamente proporcional à concentração. Em contraste, a densidade ótica reflete a perda de fótons que atingem o fotodetector devido ao espalhamento da luz por objetos refrativos (células bacterianas), que os deflete para longe do detector. No entanto, quando a densidade de células se torna suficientemente elevada, existe uma probabilidade crescente que os fótons defletidos sofram um segundo espalhamento que os deflete de novo em direção ao detector. É por esta razão que é aconselhável diluir as amostras antes de efetuar medidas de densidade ótica se a densidade ótica exceder 0.4-0.5.
bp-4.6-3	Para a conversão de densidade ótica em concentração de biomassa celular, deve ser utilizada a relação empírica $OD_{610nm} = 1,0 \Leftrightarrow [\text{biomassa}] \approx 1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$.
bp-5.2-1	No teste da oxidase, o reagente principal aplicado é a N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD), ou a sua forma de cloridrato (dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina), que funciona como um aceptor

	artificial de elétrons, transformando-se de incolor para uma cor azul-escura ou roxa na presença da enzima citocromo c oxidase. O reagente é usado em discos de papel filtro ou em solução, sendo que a mudança de cor indica que a bactéria é oxidase-positiva, característica de aeróbios
bp-5.2-2	Um Tubo de Durham (ou de Duran) é um pequeno tubo de vidro invertido, usado em microbiologia para detectar a produção de gás por microrganismos durante a fermentação de carboidratos em meios de cultura líquidos, capturando bolhas de gás (como CO ₂) para indicar um resultado positivo no teste. É um equipamento essencial em testes de identificação bacteriana, como o teste de fermentação de açúcares.
bp-5.2-3	Reagente de Kovacs é um reagente para detectar a produção de indol por microrganismos como <i>Enterobacteriaceae</i> que degradam o aminoácido triptofano, formando um composto vermelho-escuro (indol) na presença do reagente, que contém 4-dimetilaminobenzaldeído, ácido clorídrico e álcool (isoamílico ou n-butanol), sendo um teste crucial para a identificação bioquímica de bactérias em laboratório, diferenciando, por exemplo, <i>Escherichia coli</i> (positiva para indol) de outros gêneros) em meio SIM (ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM) é um meio semissólido usado para diferenciar bacilos entéricos com base na produção de sulfeto, formação de indol e motilidade).
bp-5.2-4	O gás produzido (principalmente CO ₂) é um subproduto do metabolismo dos carboidratos e, junto com a cor desenvolvida (amarelo para ácido, vermelho para alcalino) e a formação de sulfureto de hidrogênio (H ₂ S, precipitado preto), identifica a bactéria.



BIOGLOSSÁRIO


A

Absorvância Absorvância (Abs) Também conhecida como densidade ótica (OD), é a quantidade de luz absorvida por uma solução. É adimensional.

Ácido lipoteicóico O ácido lipoteicóico é um anfifílico de adesão associado à superfície de bactérias Gram-positivo e regulador de enzimas autolíticas da parede celular (muramidases). É liberado das células bacterianas principalmente após bacteriólise induzida por lisozima ou antibióticos beta-lactâmicos.

Ácido N-acetilmurâmico (NAM) Monossacarídeo crucial e exclusivo do peptidoglicano, o polímero que forma a parede celular bacteriana, funcionando como um bloco de construção que alterna com a N-acetilglucosamina (NAG) para conferir rigidez e proteção à célula bacteriana.

Ácido teicóico Copolímeros bacterianos de fosfato de glicerol ou fosfato de ribitol e carboidratos, ligados por ligações fosfodiéster. Encontram-se na parede celular de bactérias Gram-positivo e estão envolvidos, entre outras funções, na regulação da morfologia celular, bem como na divisão celular.




Adonitol O Adonitol (também conhecido como Ribitol) é um álcool de açúcar de cinco carbonos (pentitol) derivado da redução da ribose. Ele desempenha papéis fundamentais tanto na estrutura de vitaminas quanto na identificação de microrganismos em laboratório. Nem todas as bactérias conseguem metabolizar o adonitol. Por isso, ele é incluído em painéis bioquímicos (como as galerias API) para diferenciar gêneros e espécies, especialmente entre as Enterobacteriaceae. É encontrado em plantas (como *Adonis vernalis*) e como componente de ácidos teicóicos em bactérias Gram-positivo.

Ágar Ou ágar-ágar, é uma substância gelatinosa constituída por polissacarídeos obtidos das paredes celulares de algumas espécies de algas vermelhas, principalmente de "ogonori" e "tengusa". O ágar é uma mistura de dois componentes, o polissacarídeo linear agarose e uma mistura heterogênea de moléculas menores chamadas agarpectina.

Água ultrapura Água ultrapura é a água que foi purificada com especificações muito rigorosas, contendo por definição apenas H₂O e íons H⁺ e OH⁻ em equilíbrio. A condutividade da água ultrapura é de cerca de 0,055 µS/cm a 25 °C, também expressa como resistividade de 18,2 MOhm.

Alça de Drigalski Também chamada de espalhador de células ou simplesmente espalhador Drigalski, este equipamento é composto por uma haste de metal, vidro ou plástico, dobrada em formato de triângulo, L ou T. Sua função principal é espalhar suspensões celulares sobre a superfície do meio nutritivo de forma uniforme e delicada.



Alça de inoculação A alça de inoculação (também conhecida como alça bacteriológica ou ansa) é um dos instrumentos mais icônicos e essenciais em um laboratório de microbiologia. Sua função principal é a transferência segura e precisa de microrganismos de um local para outro (do tubo para a placa, de uma colônia para um meio líquido, etc.). Existem dois formatos principais, cada um com uma finalidade específica: (i) alça em "anel" (loop) (possui um pequeno círculo na ponta, sendo usada para coletar gotas de líquidos (devido à tensão superficial) e para espalhar bactérias na superfície de meios sólidos (ágar)), e (ii) agulha de inoculação (reta) (não possui o anel na ponta, sendo ideal para a técnica de picada (semear no interior do meio sólido) ou para coletar uma colônia muito específica e pequena em uma placa densa).

Amplicon Um amplicon é um segmento de DNA ou RNA que foi copiado ou amplificado, seja artificialmente (mais comum em laboratório, via PCR) ou naturalmente (como duplicação gênica), sendo fundamental para estudar regiões específicas do genoma.

Anfipático Uma molécula é considerada anfipática (ou anfifílica) quando possui, na mesma estrutura, uma parte hidrofílica (afinidade com a água) e uma parte hidrofóbica (sem afinidade à água). Essa dualidade é o que permite a existência da vida como a conhecemos, pois é a base da formação de todas as membranas biológicas.

Anfitríquio Um flagelo em cada extremidade da célula.




B

Bactéria Gram-positivo Bactéria que possui parede celular espessa composta basicamente por peptidoglicano.

Bactéria Gram-negativo Bactéria que possui parede celular formada por uma delgada camada de peptidoglicano sobre a qual se encontra outra camada composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos, denominada de membrana externa.

Bactéria multirresistente Quando uma bactéria é resistente a mais de um antibiótico.

Bacteriófago Ou simplesmente, fagos, são vírus que infectam única e exclusivamente células bacterianas susceptíveis. Os fagos foram descobertos independentemente por Frederick Twort em 1915 e por Félix D’Herelle em 1917. Alguns fagos são virulentos (lisando a célula hospedeira susceptível e liberando a nova progenia vírica), enquanto outros são temperados (integrando o seu material genético no DNA cromossômico da bactéria hospedeira, entrando assim num estado de lisogenia). Como os bacteriófagos funcionam é em parte devido à sua estrutura distintiva. Muitos têm uma cápside icosaédrica, um pouco como um dado com 20 faces, que contém o seu DNA, sobre uma cauda que possui fibras que parecem pernas. Estas fibras ligam-se a receptores na superfície das células e são diferentes para cada fago. Uma vez que o fago se ligue à bactéria, ele injeta o seu próprio DNA no citoplasma da bactéria e sequestra a maquinaria celular bacteriana por



forma a se replicar no seu interior, até que a célula bacteriana atinja a capacidade máxima. Neste ponto, a célula rebenta e morre, e os fagos no seu interior são liberados para o meio exterior onde continuam a matar mais células da mesma bactéria. Se não encontrarem mais células bacterianas do hospedeiro, simplesmente desaparecem.

Biomassa Quantidade de células bacterianas (viáveis ou não) presentes num determinado volume de suspensão.

BLAST O BLAST (acrônimo para Basic Local Alignment Search Tool) é uma das ferramentas de bioinformática mais utilizadas no mundo. Ele funciona como um "Google" para sequências biológicas, permitindo que pesquisadores comparem uma sequência de DNA, RNA ou proteína contra um banco de dados gigantesco para encontrar semelhanças. Em vez de tentar alinhar cada letra individualmente (o que seria computacionalmente impossível nos dias de hoje), o BLAST usa uma técnica heurística para encontrar rapidamente regiões de similaridade local.




C

Catalase A catalase é uma enzima antioxidante (EC 1.11.1.6) encontrada em quase todos os organismos aeróbicos, que catalisa a rápida decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Ao remover o H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio tóxica, a catalase protege as células contra danos oxidativos. É comumente utilizada como marcador bioquímico de defesa contra o estresse oxidativo e como enzima diagnóstica em microbiologia (por exemplo, o teste da catalase para diferenciar espécies bacterianas).

Cepa bacteriana Uma cepa bacteriana é uma variante genética, um subtipo ou uma cultura dentro de uma espécie biológica.

Citoesqueleto O citoesqueleto bacteriano é uma rede de filamentos proteicos que, apesar de não ser idêntico ao dos eucariotos, é essencial para a forma, divisão, polaridade e organização celular das bactérias, com proteínas homólogas à actina (MreB) e tubulina (FtsZ) desempenhando funções cruciais, como a manutenção da forma celular e a segregação cromossômica.

Citoplasma bacteriano O citoplasma, ou protoplasma, das células bacterianas é onde as funções para o crescimento celular, metabolismo e replicação são realizadas. É uma matriz semelhante a um gel, composta por água, enzimas, nutrientes, metabolitos e gases, contendo estruturas celulares como ribossomos, um cromossomo e plasmídeos.




Coagulase A coagulase é uma proteína semelhante a uma enzima que tem a capacidade de converter o fibrinogênio (proteína solúvel no plasma) em fibrina (proteína insolúvel que forma coágulos). Laboratorialmente, o teste da coagulase (em tubo ou lâmina) é usado para distinguir *S. aureus* (positivo) de outros estafilococos (negativos), ajudando no diagnóstico e identificação de patógenos.

Coleção de culturas As culturas das coleções são usadas por pesquisadores que precisam garantir a si mesmos e aos outros que os materiais que estão usando são autênticos, para que as conclusões de seus estudos sejam válidas e relevantes. A título de exemplo, ATCC (EUA) e DSMZ (Alemanha) são entidades que se responsabilizam pelos depósitos de biomateriais e o desenvolvimento de suas tecnologias para preservação e manutenção.


Colônia bacteriana Uma colônia bacteriana é um agrupamento visível de milhares ou milhões de células bacterianas que se originaram de uma única célula-mãe (ou de um pequeno grupo de células idênticas) depositada em um meio de cultura sólido. Na microbiologia, a colônia é a unidade básica para o estudo da morfologia colonial e para a obtenção de culturas puras.

Coloração de Gram A Coloração de Gram é a técnica de coloração mais importante e amplamente utilizada na microbiologia clínica e diagnóstica. Desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram, ela permite classificar as bactérias em dois grandes grupos com base nas diferenças estruturais de suas paredes celulares: Gram-



positivo e Gram-negativo. A diferença na coloração deve-se à quantidade de peptidoglicano (molécula composta por NAM e NAG) na parede celular. Gram-positivo: possuem uma camada muito espessa de peptidoglicano que retém o complexo de corante primário; Gram-negativo: possuem uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipídeos, que é facilmente dissolvida pelo álcool, permitindo a saída do corante. O protocolo da coloração de Gram envolve quatro reagentes aplicados em uma sequência específica sobre um esfregaço fixado: (i) corante primário (cristal violeta): cobre-se a lâmina por 1 min. Todas as células ficam roxas; (ii) mordente (lugol/iodo): aplica-se por 1 min. O iodo entra na célula e forma um complexo grande e insolúvel com o cristal violeta; (iii) descolorante (álcool ou acetona): é o passo crítico (alguns segundos) (nas bactérias Gram-positivo, o álcool desidrata o peptidoglicano, "fechando" os poros e prendendo o corante, enquanto nas bactérias Gram-negativo o álcool dissolve a membrana externa e o corante escapa); (e (iv) contra-corante (safranina ou fucsina): aplica-se por 30-60 s. As células descoloradas (Gram-negativo) absorvem o vermelho, enquanto as roxas permanecem roxas.

Corante púrpura cristal violeta O Cristal Violeta (também conhecido como Violeta Gentiana) é um corante orgânico sintético da família dos derivados do trifenilmetano. Na microbiologia e na histologia, ele é um dos reagentes mais importantes devido à sua afinidade com componentes celulares carregados negativamente. O uso mais famoso do cristal violeta é como corante primário na técnica de Coloração de Gram.



Corante vermelho Safranina A Safranina (ou Safranina O) é um corante biológico de cor avermelhada, pertencente ao grupo dos corantes azínicos. Na microbiologia, ela desempenha o papel crucial de contra-corante, permitindo a visualização de estruturas que não retiveram o primeiro corante aplicado na coloração de Gram.

Cromossomo bacteriano O cromossomo bacteriano (ou nucleóide) é a região onde se encontra o DNA bacteriano, apresentando-se geralmente como uma única molécula de DNA de dupla fita circular.


Cultura bacteriana Crescimento e multiplicação de células bacterianas num meio de cultura específico, em condições assépticas e com temperatura controlada.

D

Densidade ótica A densidade ótica (OD) ou absorvância de um material é uma razão logarítmica de intensidade da luz que incide sobre o material, para a luz transmitida através do material. A densidade ótica é um método de quantificar o crescimento microbiano em relação à turbidez de um inóculo, ou seja, sua densidade ótica.

Descontaminação Processo de eliminação de microrganismos.

Desinfecção Processos físicos ou químicos que permitem matar microrganismos.




DNA O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) é a molécula fundamental da vida que carrega as instruções genéticas para o desenvolvimento e funcionamento de todos os organismos, armazenando e transmitindo características hereditárias através de sua estrutura de dupla hélice, composta por sequências de bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina, Guanina) que codificam proteínas e são essenciais para a hereditariedade.

E

Eletroforese em gel de agarose Técnica de biologia molecular que separa fragmentos de DNA (ou RNA/proteínas) por tamanho, usando um campo elétrico através de uma matriz de gel porosa, onde moléculas menores migram mais rápido. O processo envolve preparar um gel de agarose, carregar amostras (com um marcador de peso molecular e corante) em poços, aplicar corrente elétrica (DNA, negativo, vai para o polo positivo) e visualizar as bandas fluorescentes sob luz UV, revelando o tamanho e integridade do DNA.

Endofítico O termo endofítico refere-se a organismos (geralmente fungos ou bactérias) que vivem no interior dos tecidos de uma planta durante pelo menos parte de seu ciclo de vida, mas não causam doenças aparentes ao hospedeiro. Diferente dos patógenos que invadem a planta para destruí-la, os endófitos estabelecem uma relação de simbiose ou comensalismo. Os microrganismos endofíticos entram na planta através de aberturas naturais (estômatos), ferimentos




ou pela raiz, e colonizam os espaços entre as células (espaço apoplástico) ou o interior delas.

Endotoxina Endotoxina é o lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula tóxica presente na membrana externa de bactérias Gram-negativo (como E. coli, Salmonella) que é liberada quando a bactéria lisa (Gorbet; Sefton, 2005), causando fortes reações imunes no hospedeiro, como febre, inflamação, e até choque séptico e falência de múltiplos órgãos, sendo um contaminante crítico em produtos médicos.

Epifítico O termo epifítico refere-se a um organismo (geralmente uma planta ou microrganismo) que vive sobre a superfície de outro organismo vegetal, utilizando-o apenas como suporte, sem retirar nutrientes ou parasitar o hospedeiro. A palavra vem do grego: epi (em cima) e phyton (planta).

Esporo O termo esporo refere-se a uma unidade reprodutiva ou de sobrevivência, altamente resistente e especializada, produzida por diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas (musgos e samambaias) e alguns protozoários. Em bactérias (como os gêneros Bacillus e Clostridium), o esporo não tem função de reprodução, mas sim de sobrevivência extrema. É uma célula "adormecida" com múltiplas camadas protetoras de queratina, pouco conteúdo de água e uma alta concentração de dipicolinato de cálcio, que protege o DNA.

Esterilização Processo que mata e/ou elimina todas as classes de microrganismos e esporos.




Exoenzima Exoenzimas (ou enzimas extracelulares) são enzimas produzidas e secretadas por células para atuar fora do ambiente celular, sendo cruciais para a hidrólise de moléculas grandes, quebra de substratos no ambiente externo e processos de infecção/patogenicidade em microrganismos, como proteases e lipases, facilitando a nutrição ou a invasão de tecidos.

F

Fase exponencial de crescimento Após um período de tempo durante o qual a taxa de crescimento das células aumenta gradualmente, as células crescem a uma taxa máxima constante e esse período é conhecido como fase log, ou exponencial, e o aumento na concentração de biomassa será proporcional à concentração inicial de biomassa.

Fastidiosa Uma bactéria fastidiosa é qualquer microrganismo que possui exigências nutricionais complexas e específicas para crescer em laboratório. O termo vem do latim *fastidiosus*, que significa "difícil de agradar" ou "exigente". Por exemplo, a *Xylella fastidiosa* é uma das bactérias mais temidas da agricultura mundial. Ela é uma bactéria Gram-negativo que vive exclusivamente no xilema (o tecido das plantas responsável por transportar água e sais minerais das raízes para as folhas), sendo o exemplo perfeito de uma bactéria fastidiosa: cresce de forma extremamente lenta e exige meios de cultura muito específicos. A *Xylella* não produz toxinas que matam as células diretamente. O seu




"ataque" é mecânico e estratégico: ao entrar no xilema, a bactéria se multiplica e produz uma substância viscosa (exopolissacarídeos), formando um biofilme que age como um "coágulo", bloqueando fisicamente os vasos do xilema e fazendo com que a planta perca a capacidade de transportar água.

Fenótipo Características observáveis de um microrganismo, como sua estrutura, metabolismo, comportamento, resistência a antibióticos e interação com o ambiente (hospedeiro), que resultam da interação complexa entre seu genótipo (DNA) e fatores ambientais.

Fitobacteriose Termo geral para qualquer doença de planta causada por bactérias fitopatogênicas.

Flagelo O flagelo bacteriano é uma nanomáquina complexa, uma organela locomotora em forma de chicote ou hélice, composta por proteínas como a flagelina, que permite às bactérias se moverem em ambientes líquidos através de rotação. Impulsionado por um fluxo de prótons (força motriz), esse motor molecular complexo tem diferentes arranjos (peritríquio, lofotríquio, etc.) e é crucial para a motilidade, a quimiotaxia (busca por alimento/fuga de substâncias tóxicas) e a virulência de muitas bactérias.




Flambagem Técnica de aquecer alças de inoculação (como as de Drigalski) e agulhas no fogo (bico de Bunsen ou chama) até ficarem incandescentes ("ao rubro") para esterilizar rapidamente, eliminando microrganismos vegetativos por oxidação celular, sendo crucial para a assepsia em manipulações, como na semeadura por estriamento, necessitando resfriamento antes do uso.

Função de Gompertz Modelo matemático sigmoidal (curva em "S") que descreve o crescimento lento no início e no fim, aproximando-se assintoticamente de um limite máximo. A forma mais comum da função de Gompertz é expressa como $F(t) = ae^{(-be^{(-ct)})}$, onde a (assíntota) é o valor máximo que a função atinge (o "teto" do crescimento), b (deslocamento) determina a posição da curva ao longo do eixo horizontal (tempo), c (taxa de crescimento) determina a rapidez com que o sistema se aproxima da assíntota, e e é a base do logaritmo natural (número de Euler: 2,718281828459045...).

G


Galeria API® A Galeria API (do francês Appareil et Procédé d'Identification) é um sistema de identificação bioquímica padronizado e miniaturizado para microrganismos. Criada pela BioMérieux, ela revolucionou os laboratórios ao substituir dezenas de tubos de ensaio individuais por uma única fita plástica. A galeria consiste em uma fita com vários compartimentos pequenos (chamados de microtubos ou cúpulas) que contêm substratos desidratados para diferentes testes bioquímicos em 4 etapas: (i) inoculação



uma suspensão da bactéria pura é preparada em solução salina), (ii) reidratação (a suspensão é pipetada em cada cúpula, reidratando os reagentes), (iii) incubação (a galeria é colocada em uma câmara úmida e incubada (geralmente a 37 °C por 18 a 24 h)), e (iv) metabolismo (durante a incubação, o metabolismo da bactéria altera a cor dos substratos (mudança de pH, oxidação, hidrólise, etc.)).

Galeria BD BBL™ A Galeria BD BBL (frequentemente referida pelo nome comercial Crystal ou pelos sistemas Enterotube) é a solução da empresa Becton Dickinson (BD) para a identificação bioquímica de microrganismos. Assim como o sistema API da BioMérieux, o objetivo aqui é identificar bactérias através de suas reações metabólicas, mas com designs de hardware bem distintos.


Galeria Biolog™ A Galeria Biolog representa uma abordagem diferente na identificação microbiana em comparação aos sistemas API ou VITEK. Enquanto os sistemas tradicionais focam em 20 ou 30 testes bioquímicos específicos, o sistema Biolog utiliza a Tecnologia de Impressão Digital Metabólica baseada no uso de fontes de carbono. O princípio fundamental é simples: se uma bactéria consegue metabolizar um determinado nutriente, ela gera energia que altera a cor de um indicador químico. A galeria Biolog é uma placa de 96 poços. Cada um desses poços contém uma fonte de carbono diferente (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, etc.) e um corante indicador (geralmente tetrazólio). Uma suspensão da bactéria é colocada em todos os 96 poços. Se a bactéria utiliza o carbono de um poço específico, ocorre uma reação de



oxidação. Essa reação libera elétrons que reduzem o corante tetrazólio, mudando sua cor de transparente para púrpura (roxo).

Galeria VITEK® O VITEK (especialmente as versões VITEK 2 e VITEK MS) é o padrão-ouro da automação em microbiologia clínica. Desenvolvido pela BioMérieux, ele é o sucessor tecnológico das Galerias API, automatizando todo o processo de identificação bacteriana e testes de sensibilidade a antibióticos (TSA).

Gene 16S rRNA O gene 16S rRNA codifica o RNA ribossômico 16S, um componente essencial dos ribossomos bacterianos e arqueanos, fundamental para a tradução de proteínas, sendo usado como uma "impressão digital" ou um "código de barras" biológico para identificar e classificar microrganismos devido às suas regiões conservadas e variáveis, que permite aos cientistas determinar quem é o microrganismo e quão próximo ele está de outros evolutivamente. O gene codifica a unidade 16S do ribossomo procariótico, que faz parte da subunidade menor (30S). Essa estrutura é essencial para a síntese de proteínas, pois é ela que reconhece o local onde a tradução do mRNA deve começar. Uma das razões principais que tornam o 16S o padrão-ouro na microbiologia prende-se com a universalidade: ele está presente em todas as bactérias. Como a síntese de proteínas é vital, nenhuma bactéria pode existir sem ele.



Genótipo O genótipo em microbiologia refere-se ao conjunto completo de genes e à constituição genética específica de um microrganismo (como bactérias, vírus ou fungos). Ele é determinado pela sequência de DNA no cromossomo bacteriano e em elementos extracromossômicos, como plasmídeos. Enquanto o fenótipo representa as características observáveis (ex: resistência a antibióticos), o genótipo representa o "manual de instruções" que determina essas características.

Glicocálice Camada externa, viscosa e rica em carboidratos (açúcares) presente na superfície de muitas células microbianas, como bactérias, que funciona como uma cápsula ou camada de limo, essencial para proteção contra fagocitose e desidratação, adesão a superfícies (formação de biofilmes) e reconhecimento celular, sendo crucial para a virulência e sobrevivência bacteriana em ambientes hostis.

H

Húmus O húmus é a camada mais estável, escura e fértil da matéria orgânica presente no solo. Ele é o resultado final de um longo processo de decomposição de restos de plantas, animais e microrganismos, realizado por fungos, bactérias e animais detritívoros (como as minhocas). Diferente da matéria orgânica "fresca" (como uma folha que acabou de cair), o húmus já passou por um processo chamado humificação, tornando-se uma substância química complexa que não se decompõe mais com facilidade.



I

Incubação Manutenção de culturas de microrganismos em condições de temperatura favoráveis ao seu crescimento.


Inóculo Material contendo microrganismos utilizado para inoculação de meio de cultura líquido e para semear em meios de cultura sólidos.

L

Lactose Dissacarídeo composto por glicose e galactose.

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) Um método de diagnóstico molecular rápido e altamente sensível que amplifica o DNA a uma temperatura única e constante, eliminando a necessidade de termocicladores complexos usados na PCR. Ele utiliza um conjunto exclusivo de quatro a seis primers e uma DNA polimerase de deslocamento de fita para criar grandes quantidades de DNA-alvo, permitindo a detecção rápida por meio de métodos simples, como turbidez ou mudança de cor.


Levan O Levan (ou levana) é um polímero natural de frutose (um frutano) unido por ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow6)$. Ele é produzido por uma grande variedade de microrganismos (bactérias e fungos) e por algumas poucas espécies de plantas. Na microbiologia, o levan é frequentemente visto como uma substância viscosa ou mucosa que envolve as colônias bacterianas, funcionando como um componente essencial do exopolissacarídeo (EPS).



A síntese do levan ocorre fora da célula bacteriana através de uma enzima chamada levansucrase, que hidroliza a sacarose e libera glicose, polimerizando as unidades de frutose em cadeias longas e altamente ramificadas.

Lipopolissacarídeo O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido e o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativo. O lipopolissacarídeo está localizado na camada externa da membrana e está, em cepas não encapsuladas, exposto na superfície celular. Os lipopolissacarídeos normalmente consistem em um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A (ou endotoxina), um oligossacarídeo nuclear não repetido e um polissacarídeo distal (ou antígeno O).

Lipoproteínas de Braun As Lipoproteínas de Braun (também conhecidas como Lpp) são as proteínas mais abundantes nas bactérias Gram-negativo (como a E. coli). Elas desempenham um papel estrutural crítico, funcionando como "âncoras" que mantêm a integridade da parede celular. A principal função da Lipoproteína de Braun é conectar fisicamente a membrana externa ao peptidoglicano (a camada de rigidez da parede celular), atravessando o espaço periplasmático. Uma extremidade da proteína (a parte lipídica) fica mergulhada na membrana externa, enquanto a outra extremidade (a parte proteica) está ligada covalentemente ao açúcar do peptidoglicano. Sem essa âncora, a membrana externa se desprenderia facilmente da célula, resultando em instabilidade estrutural e morte da bactéria.




Lofotríquio Agrupamentos de flagelos aglomerados em uma ou em ambas as extremidades da célula.

Luvas de nitrilo As luvas de nitrilo (ou nitrílicas) são feitas de um polímero sintético chamado borracha de acrilonitrilo-butadieno. Elas se tornaram o padrão ouro em laboratórios devido à sua alta resistência. Como são sintéticas, não contêm as proteínas do látex natural que causam reações alérgicas graves (hipersensibilidade do Tipo I) em muitos profissionais. São significativamente mais resistentes a óleos, graxas, solventes e combustíveis do que as luvas de vinil ou látex. Oferecem maior proteção contra perfurações, rasgos e abrasão, sendo conhecidas por serem "três vezes mais resistentes a furos" que o látex.

M

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) Uma poderosa técnica de espectrometria de massa que identifica rapidamente moléculas como proteínas, peptídeos e polímeros, analisando sua relação massa/carga. Essa técnica é crucial em microbiologia clínica para a rápida identificação de patógenos (bactérias/fungos) e detecção de resistência a medicamentos, oferecendo velocidade, precisão e custo-benefício superiores aos métodos tradicionais. Um laser dissolve e ioniza a amostra misturada com uma matriz, enviando esses íons através de um tubo de voo onde seu "tempo de voo" até um detector determina sua massa,




criando uma impressão digital espectral única para identificação.

Meio de cultura Conjunto de substâncias e nutrientes necessários para o crescimento e multiplicação de microrganismos in vitro.

Meio Ágar Citrato de Simmons O Ágar Citrato de Simmons é um meio de cultura diferencial usado em microbiologia para identificar bactérias (especialmente

Enterobacteriaceae capazes de usar o citrato como única fonte de carbono e energia, resultando em uma mudança visível de cor (verde para azul) devido à produção de compostos alcalinos, com o indicador azul de bromotimol. Ele serve para diferenciar bactérias como *Escherichia coli* (negativo) de *Enterobacter aerogenes* (positivo), sendo crucial em análises clínicas, alimentares e de água.


Meio Baird-Parker Ágar (BPA) Meio de cultura seletivo e diferencial, fundamental em microbiologia para o isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos coagulase-positivos, especialmente em amostras de alimentos, laticínios e cosméticos, diferenciando-os por colônias pretas com halos claros devido à sua ação enzimática. Contém cloreto de lítio e telurito de potássio para inibir o crescimento da maioria das outras bactérias, promovendo *Staphylococcus*. Incorpora gema de ovo e piruvato, que permitem que *S. aureus* forme colônias pretas brilhantes com halos claros (reação de lipase e protease) ao redor, indicando sua presença.



Meio Bile Esculin Azide Ágar (BEAA) Meio de cultura seletivo e diferencial usado em microbiologia para isolar e identificar Enterococos (Grupo D de estreptococos) e outras bactérias específicas, como *Yersinia enterocolitica*, de amostras de alimentos e produtos farmacêuticos, utilizando a capacidade de hidrólise da esculina, que causa uma mudança de cor para preto ou marrom-escuro.


Meio BSA (Bismuth Sulfite Ágar) O Ágar Sulfito de Bismuto (BSA ou BSAg), frequentemente referenciado como meio de Wilson-Blair, é um meio de cultura seletivo e diferencial altamente específico para o isolamento e cultivo de espécies de Salmonella, com ênfase especial na *Salmonella Typhi* e outras Salmonellas produtoras de H₂S (gás sulfídrico). É amplamente utilizado na análise microbiológica de alimentos, amostras clínicas e ambientais.

Meio Christensen O Meio de Christensen (Agar Ureia Base) é um meio de cultura microbiológico usado para detectar a produção da enzima urease por bactérias, especialmente para diferenciar enterobactérias como o gênero Proteus, que rapidamente hidrolisam a ureia, tornando o meio rosa devido à mudança de pH. Ele consiste em uma base com peptona, glicose, sais e o indicador vermelho de fenol, sendo preparado com a adição separada de ureia, permitindo a identificação de microrganismos urease-positivos. Auxilia na identificação de bactérias como Proteus, Klebsiella, Enterobacter, que produzem urease, e as que não produzem (como *E. coli*). A detecção de urease determina a capacidade de um organismo decompor a ureia em amônia e dióxido de carbono, alcalinizando o meio.



Meio Eosin Methylene Blue Ágar (EMB Ágar) O Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) é um meio de cultura microbiológico seletivo e diferencial, usado para isolar e diferenciar bactérias Gram-negativo, como as enterobactérias (coliformes), com base na sua capacidade de fermentar lactose ou sacarose. Os corantes Eosina Y e Azul de Metileno inibem bactérias Gram-positivo e atuam como indicadores de pH, fazendo com que colônias fermentadoras fiquem escuras ou com brilho verde-metálico (como a *E. coli*), enquanto não fermentadoras permanecem incolores ou rosa-claras, sendo essencial na análise de água e alimentos para identificar contaminação. Inibe o crescimento de bactérias Gram-positivo devido aos corantes. Distingue bactérias que fermentam lactose/sacarose (fermentadoras) das que não fermentam (não fermentadoras).


Meio HE Ágar (Hektoen Enteric Ágar) O Ágar Hektoen (Hektoen Enteric Agar - HEA) é um meio de cultura microbiológico seletivo e diferencial, usado para isolar e diferenciar *Salmonella* e *Shigella* de amostras clínicas e alimentares, inibindo Gram-positivos e distinguindo fermentadores (colônias amarelas/laranjas) de não-fermentadores (verdes), além de detectar a produção de sulfureto de hidrogênio (H_2S), que causa pontos pretos nas colônias, como na *Salmonella*. Inibe o crescimento de bactérias Gram-positivo e muitas Gram-negativo com sais biliares e corantes, favorecendo *Salmonella* e *Shigella*. Colônias amarelas/laranjas indicam fermentação de açúcares (lactose/sacarose/salicina) (ex: *E. coli*); colônias verdes indicam não-fermentação de açúcares (lactose/sacarose/salicina) (ex: *Shigella*, *Salmonella*).



Colônias com centro preto (produção de H₂S devido ao citrato de amônio férrico e tiosulfato de sódio) são típicas de Salmonella.


Meio Herellea Ágar O Ágar Herellea é um meio de cultura seletivo e diferencial formulado para o isolamento e identificação de bactérias Gram-negativo, particularmente do grupo Herellea (atualmente classificado como *Acinetobacter* spp.), *Mima* e outros organismos não fermentadores. É frequentemente utilizado em amostras clínicas (uretrais, vaginais) e, às vezes, em amostras de alimentos para separar esses microrganismos de bactérias Gram-positivo e membros da família Enterobacteriaceae. A presença de sais de bile inibe o crescimento de bactérias Gram-positivo e algumas outras espécies, favorecendo o crescimento de *Acinetobacter* e *Mima*. Utiliza lactose e maltose como carboidratos fermentáveis e o púrpura de bromocresol como indicador de pH. Inicialmente, o meio tem uma cor púrpura (violeta).

Meio 523 de Kado e Heskett O Meio 523 de Kado e Heskett é um meio de cultura não seletivo usado em microbiologia para o cultivo de bactérias, especialmente fitopatogênicas como *Xanthomonas* e *Ralstonia*, contendo ingredientes como sacarose, caseína hidrolisada, extrato de levedura, fosfato e sulfato de magnésio, servindo para isolamento, crescimento e detecção dessas bactérias em pesquisas fitopatológicas e de bacteriocinas. A formulação original é de Kado e Heskett (1970), sendo amplamente referenciada em publicações científicas.




Meio KF Streptococcus Ágar O Meio KF Streptococcus Ágar (Kenner Fecal) é um meio de cultura seletivo e diferencial usado para isolar e contar estreptococos fecais (como os do grupo D) em amostras de água, alimentos e outros materiais, utilizando TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) como indicador para revelar as colônias como pontos vermelhos/marrons, sendo essencial para a detecção de contaminação fecal, pois inibe outros microrganismos.

Meio King's B Ágar (KB) O Meio King's B Ágar (KB), também conhecido como Ágar Pseudomonas F, é um meio de cultura sólido utilizado no laboratório de microbiologia para o cultivo, isolamento e, principalmente, a diferenciação de espécies de Pseudomonas. A sua principal finalidade é estimular a produção de pigmentos fluorescentes, como a pioverdina (ou fluoresceína), por *Pseudomonas aeruginosa* e outros pseudomonas fluorescentes. O King's B é projetado para realçar a produção de pioverdina (pigmento fluorescente amarelo-esverdeado) e, ao mesmo tempo, inibir a produção de piocianina (pigmento azul). É amplamente usado para confirmar *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água, alimentos e outros materiais.



Meio LB (Luria Bertani) O Meio Luria-Bertani (LB) é um meio de cultura bacteriana rico em nutrientes, amplamente usado em microbiologia e biologia molecular para o cultivo e manutenção de *Escherichia coli* e outras bactérias não exigentes, fornecendo o que precisam para crescimento, produção de proteínas recombinantes e clonagem de plasmídeos, contendo triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio, sendo essencial em laboratórios de pesquisa e diagnóstico.


Meio Leeds Acinetobacter Medium (LAM) O Leeds Acinetobacter Medium (LAM) é um meio de cultura seletivo e diferencial, desenvolvido para isolar *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e ambientais, destacando-se pela alta seletividade e recuperação superior de *Acinetobacter* em comparação com outros meios, com *Acinetobacter* produzindo colônias rosadas mucoides e difusão da cor rosa/mauve no meio, devido ao seu metabolismo de carboidratos e nitrogênio, sendo crucial para a identificação de bactérias multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*. Contém antibióticos (como cefsulodin, cefradina e vancomicina) para inibir bactérias Gram-negativo e Gram-positivo contaminantes, permitindo o crescimento de *Acinetobacter*. Utiliza a fermentação de carboidratos (fructose, sucrose) e o metabolismo de nitrogênio, com o indicador de pH (fenol vermelho) resultando em colônias cor-de-rosa (devido à produção de amônia) ou amareladas (por uso de carboidratos), diferenciando *Acinetobacter* de outras bactérias.



Meio MacConkey Ágar Meio de cultura microbiológico seletivo e diferencial, crucial para isolar e distinguir bactérias Gram-negativo, especialmente as da família Enterobacteriaceae, diferenciando aquelas que fermentam a lactose (formando colônias róseas/vermelhas) das que não fermentam (colônias incolores), devido à presença de sais biliares, cristal violeta (inibidores de bactérias Gram-positivo) e lactose como fonte de carbono, com vermelho neutro como indicador de pH, muito usado em análises clínicas e de alimentos.

Meio Mannitol Salt Ágar (MSA) O Ágar Sal Manitol (MSA) é um meio de cultura seletivo e diferencial, crucial para isolar e identificar estafilococos patogênicos, especialmente *Staphylococcus aureus*, a partir de amostras clínicas e alimentícias; sua alta concentração de sal (7,5% NaCl) inibe outras bactérias, enquanto o manitol e o indicador de pH vermelho de fenol permitem diferenciar os *Staphylococcus* que fermentam o manitol (ficando amarelos) daqueles que não o fazem (mantendo a cor rosa).


Meio MS (Miller and Schroth Medium) O meio de Miller-Schroth (meio MS) é um ágar seletivo especializado, utilizado em fitopatologia, desenvolvido por Miller e Schroth para isolar e identificar a bactéria causadora da queima bacteriana, *Erwinia amylovora*, em superfícies de plantas. Ele inibe outros microrganismos com componentes como sais biliares e tálio, enquanto corantes diferenciais (azul de bromotimol, vermelho neutro) auxiliam na distinção das colônias.



Meio NA (Nutrient Agar) O Meio NA (Nutrient Agar) é um meio de cultura geral, não seletivo e nutritivo, usado para o cultivo de bactérias e fungos não exigentes, fornecendo nutrientes básicos para seu crescimento em uma superfície sólida, sendo essencial em microbiologia para análise de água, alimentos e cultura de rotina, preparado com extrato de carne, peptona, cloreto de sódio e ágar, esterilizado e distribuído em placas. Contém extrato de carne (fonte de vitaminas, minerais e aminoácidos), peptona (fonte de nitrogênio e carbono) e cloreto de sódio (sal) para manter o equilíbrio osmótico. Ideal para microrganismos que não precisam de nutrientes específicos, como bactérias comuns e alguns fungos.

Meio PD2 (Periwinkle Dextrose Medium) O Meio PD2 (também conhecido como Periwinkle Dextrose Medium) é um dos meios de cultura mais específicos e historicamente importantes da fitopatologia. Ele foi desenvolvido para o cultivo de bactérias fastidiosas que habitam o xilema, especificamente a *Xylella fastidiosa*.

Meio Pseudomonas Ágar F O Meio Pseudomonas Ágar F, também conhecido como King B, é um meio de cultura seletivo para o isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp., especialmente *P. aeruginosa*, promovendo a produção de pigmentos fluorescentes (fluoresceína) e outros como a piocianina, essencial para o controle de qualidade em alimentos, água e amostras clínicas, e para pesquisa. Ele é formulado para otimizar o crescimento e a diferenciação dessas bactérias, que são comuns em ambientes aquáticos e podem causar infecções. Aprimora a produção de pigmentos




fluorescentes (amarelo-esverdeado) e outros, facilitando a identificação.

Meio Pseudomonas Ágar PO Ágar Pseudomonas P (ou Ágar Cetrimida/M-PAC) é um meio de cultura seletivo e diferencial para o isolamento, identificação e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente de amostras clínicas e ambientais, pois a cetrimida inibe outras bactérias, enquanto o meio promove a produção de pigmentos como a piocianina, característicos da *Pseudomonas*. Permite isolar seletivamente *Pseudomonas aeruginosa* de amostras com contaminação mista. Ajuda na identificação presuntiva, pois algumas espécies produzem pigmentos (como piocianina, que dá cor verde-azulada) que ficam visíveis no ágar.

Meio PSM (Pseudomonas syringae Medium) O Meio PSM (*Pseudomonas syringae Medium*) é um meio de cultura semi-seletivo utilizado em laboratórios de fitopatologia para a detecção, isolamento e cultivo de bactérias do complexo *Pseudomonas syringae*, particularmente *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (causador da queima bacteriana do alho-poró) e outros patógenos de plantas. Ele é frequentemente utilizado para isolar o patógeno a partir de sementes ou tecidos vegetais infectados, permitindo diferenciar a *P. syringae* de bactérias saprófitas (não-patogênicas) que crescem no mesmo ambiente.


Meio PWG (Periwinkle Wilt Broth with Gelrite) O Meio PWG (Periwinkle Wilt with Gelrite) é uma evolução técnica do meio PD2, desenhada especificamente para superar as dificuldades de cultivo da *Xylella fastidiosa*. Ele é



amplamente utilizado em laboratórios de fitopatologia para o isolamento primário da bactéria a partir de tecidos vegetais (como pecíolos e nervuras de folhas). A grande diferença deste meio reside na substituição do ágar comum pelo Gelrite e na inclusão de suplementos que mimetizam a seiva do xilema. Diferente do ágar tradicional (extraído de algas), o Gelrite é um polímero purificado (goma gelana) produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea*. O Gelrite produz um meio extremamente límpido, o que é crucial para observar as colônias microscópicas da *Xylella* que levam semanas para aparecer. Ele é livre de inibidores e impurezas que muitas vezes estão presentes no ágar comum e que podem impedir o crescimento de bactérias tão sensíveis (fastidiosas). Proporciona uma superfície de fixação mais firme e uniforme para a formação do biofilme bacteriano.

Meio Slanetz and Bartley Ágar O Ágar Slanetz e Bartley (ou m-Enterococcus Agar) é um meio de cultura seletivo e diferencial usado em microbiologia para a detecção, isolamento e contagem de *Enterococcus* spp. (estreptococos fecais) em amostras de água, alimentos e outros materiais, utilizando a técnica de filtração por membrana, onde os enterococos formam colônias vermelhas ou marrons características.


Meio SMSA (Selective Medium South Africa) O Meio SMSA (Selective Medium South Africa) é um meio de cultura semi-seletivo fundamental na microbiologia para detectar e isolar a bactéria *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana, em amostras de solo e vegetais, sendo que a versão SMSA-E (Elphinstone) é mais eficaz por suprimir



contaminantes, permitindo maior recuperação da *R. solanacearum*. Sua seletividade permite o crescimento preferencial da bactéria-alvo, inibindo outros microrganismos do solo.

Meio TBX Ágar O Ágar TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide) é um meio de cultura seletivo e diferencial para detectar e contar *Escherichia coli* em alimentos, água e amostras clínicas, usando um substrato cromogênico (X-Gluc) que faz com que as colônias de *E. coli* fiquem azul-esverdeadas devido à atividade da enzima beta-glucuronidase, distinguindo-as de outros coliformes. É um meio seletivo (com sais biliares/inibidores) e diferencial (cromogênico), fundamental para análise microbiológica. Sais biliares e outros agentes inibem o crescimento de outras bactérias, favorecendo *E. coli*. A *E. coli* produz a enzima beta-glucuronidase, que hidrolisa o substrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo). O cromóforo liberado confere uma coloração azul-esverdeada às colônias de *E. coli*, facilitando sua identificação.


Meio TSA (Tryptic Soy Agar) O TSA (Tryptic Soy Agar ou Agar Tryptic Soy) é um meio de cultura microbiológico geral e nutritivo, amplamente usado para cultivar uma vasta gama de bactérias, leveduras e fungos, incluindo microrganismos exigentes (fastidiosos), sendo fundamental para isolamento, contagem e testes de controle de qualidade, devido à sua composição rica em peptídeos de caseína e soja, fornecendo nitrogênio, vitaminas e aminoácidos, e solidificado com ágar para uso em placas de Petri ou tubos.



Meio TSB (Tryptic Soy Broth) O Meio TSB (Tryptic Soy Broth) é um caldo nutritivo universal e não seletivo, amplamente utilizado em microbiologia para o cultivo de uma vasta gama de microrganismos (aeróbios, anaeróbios, fungos) devido à sua rica composição em peptona de caseína e soja, glicose e sais, servindo também como meio de enriquecimento e base para outros cultivos mais complexos em laboratórios clínicos, de alimentos e farmacêuticos.


Meio TSI (Triple Sugar Iron) O Meio TSI (Triple Sugar Iron Agar) é um meio de cultura diferencial usado em microbiologia para identificar bactérias, especialmente as da família Enterobacteriaceae, testando sua capacidade de fermentar glicose, lactose e sacarose, e produzir sulfureto de hidrogênio (H₂S), crucial para diferenciar gêneros como Salmonella e Shigella, com a mudança de cor indicando os resultados. O indicador de pH é o vermelho de fenol (meio fica amarelo com ácido, vermelho/rosa com alcalino). O meio TSI é vital na identificação presuntiva de bacilos Gram-negativo, fornecendo informações rápidas sobre o metabolismo do microrganismo.

Meio TZC (ou Meio de Kelman) O Meio TZC (Cloreto de Trifenil Tetrazólio), também conhecido como Meio de Kelman (desenvolvido por Arthur Kelman em 1954), é um meio de cultura sólido específico utilizado principalmente para o isolamento, identificação e diferenciação de isolados virulentos e avirulentos da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*. Esta bactéria é a agente causal da murcha bacteriana em diversas culturas, como tomate, batata,




tabaco e pimentão. A principal característica do meio TZC é sua capacidade de diferenciar colônias virulentas de avirulentas da *R. solanacearum*. Colônias virulentas (patogênicas): apresentam aspecto mucóide, fluido, com centro róseo/vermelho e bordas brancas (ou cor creme/avermelhada); colônias avirulentas (não patogênicas): apresentam-se pequenas, secas (não fluídas) e com cor vermelha intensa/escura. O cloreto de trifenil tetrazólio (TZC) é um indicador de oxirredução. As bactérias *R. solanacearum* virulentas produzem altos níveis de polissacarídeos extracelulares (EPS), que dão a aparência mucóide/fluidal e absorvem o corante de forma diferenciada, resultando na cor branca com centro rosa. O meio Kelman é fundamental para manter a virulência das amostras em laboratório, sendo que a bactéria pode ser preservada em água destilada estéril e posteriormente caracterizada nesse meio.

Meio Voges-Proskauer O Meio Voges-Proskauer (VP) é um caldo de cultura usado para identificar bactérias que fermentam glicose produzindo acetoína (um álcool neutro), em vez de ácidos, como as enterobactérias (ex: *Klebsiella*, *Enterobacter*). O teste detecta a acetoína após incubação e adição de reagentes (alfa-naftol e KOH), formando uma cor rosa/vermelha na superfície, indicando uma fermentação por via butilenoglicólica (positiva), diferenciando-as de outras bactérias que produzem ácidos (positivas para o teste de Vermelho de Metila).



Meio Vermelho de Metila (VM/MR - Methyl Red) O Meio Vermelho de Metila (VM/MR - Methyl Red) é um teste bioquímico utilizado na microbiologia para determinar a capacidade de um microrganismo fermentar a glicose, produzindo e mantendo produtos finais ácidos estáveis (como ácido láctico, acético e fórmico). Este teste é fundamental para a diferenciação de bactérias da família Enterobacteriaceae. A bactéria é cultivada em um caldo específico (Caldo MR-VP) que contém glicose. Organismos que utilizam a via de fermentação ácida mista degradam a glicose intensamente, baixando o pH do meio para 4,5 ou menos. Após a incubação, adiciona-se o reagente Vermelho de Metila. O indicador é vermelho em pH ácido ($\leq 4,4$) e amarelo em pH neutro/básico ($\geq 6,2$). Resultado positivo (VM+): a cor do meio torna-se vermelha imediatamente ou dentro de poucos minutos, indicando a produção de ácidos estáveis (ex: *Escherichia coli*). Resultado negativo (VM-): a cor do meio torna-se amarela ou alaranjada, indicando que a acidez produzida foi consumida ou que a via de fermentação foi diferente (ex: *Enterobacter aerogenes*).


Meio Violet Red Bile Glucose Ágar (VRBG Ágar) O Ágar Violet Red Bile Glucose (VRBG) é um meio de cultura seletivo e diferencial usado para isolar e contar Enterobactérias (bactérias Gram-negativo tolerantes à bile) em alimentos e produtos farmacêuticos, substituindo a lactose por glicose para detectar essas bactérias, que formam colônias roxas com halo violeta devido à fermentação da glicose e precipitação dos sais biliares. O cristal violeta e os sais biliares inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo. A glicose é fermentada por Enterobacteriaceae, produzindo



ácido, que vira o indicador de pH (vermelho neutro) para vermelho. Isso causa colônias roxas com um halo violeta ao redor, devido à precipitação dos sais biliares.

Meio XCSM (*Xanthomonas citri* Selective Medium) O XCSM (*Xanthomonas citri* Selective Medium) é um meio de cultura semi-seletivo desenvolvido especificamente para o isolamento e detecção da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a bactéria causadora do cancro cítrico. O objetivo deste meio é permitir o crescimento do fitopatógeno enquanto inibe o desenvolvimento de outros microrganismos gram-negativos e contaminantes, comuns no solo ou em tecidos vegetais. Utiliza fontes de carbono e nitrogênio, com adição de antibióticos e/ou fungicidas para selecionar *Xanthomonas* spp. Produz colônias características (frequentemente amarelas ou com halo) após 2 a 5 dias de incubação.

Meio YDC Ágar (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Ágar) O Ágar YDC (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Agar), também conhecido como Ágar Glicose Extrato de Levedura Carbonato de Cálcio, é um meio de cultura utilizado para o isolamento e cultivo de espécies de *Erwinia* (atualmente classificadas principalmente em gêneros como *Pectobacterium* e *Dickeya*). O principal uso do meio YDC é no estudo de bactérias fitopatogênicas, como as espécies de *Erwinia*, que produzem excesso de ácido. A presença de carbonato de cálcio no meio permite a detecção visual da produção de ácido: a secreção ácida ao redor das colônias dissolve o carbonato de cálcio, resultando em uma zona clara ou halo ao redor de cada colônia bacteriana.




Melanina Bactérias produzem melanina, um pigmento escuro que oferece proteção contra estresse ambiental (como radiação UV e oxidativa) e contribui para a virulência de patógenos, sendo encontrada em espécies marinhas (*Vibrio*, *Shewanella*) e terrestres (*Streptomyces*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*). Funções da Melanina Bacteriana: (i) fotoproteção (absorve radiação UV e outras formas de energia, protegendo as células), (ii) antioxidante (neutraliza radicais livres, protegendo contra o estresse oxidativo), (iii) virulência (em patógenos, ajuda a proteger contra o sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a resistência a medicamentos e estresses), e (iv) adaptação ambiental (confere resiliência em ambientes hostis).

Monotríquio polar Um flagelo.

N

N-acetilglucosamina (NAG) A N-acetilglucosamina (NAG) é um dos dois monossacarídeos (junto com o ácido N-acetilmurâmico, NAM) que formam as cadeias de açúcares do peptidoglicano, o principal polímero estrutural da parede celular bacteriana, criando uma malha rígida que dá forma à célula e a protege contra a pressão osmótica e agentes externos. Essa estrutura é crucial para a sobrevivência bacteriana e um alvo para antibióticos, como a penicilina, que inibem sua formação. Em resumo, a N-acetilglucosamina é um componente fundamental da arquitetura da parede celular bacteriana, essencial para sua integridade estrutural.



NCBI O NCBI (National Center for Biotechnology Information) É, essencialmente, a biblioteca central do mundo para a biologia molecular e genética. Fundado em 1988 e sediado nos EUA, ele faz parte da Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH). Para pesquisadores, estudantes e profissionais de saúde, o NCBI é a ferramenta mais importante para armazenar, recuperar e analisar dados biológicos. O NCBI não é apenas um website, mas um ecossistema de bancos de dados interconectados: PubMed (o maior banco de dados de literatura biomédica do mundo, contendo milhões de resumos e citações de artigos científicos), GenBank (coleção pública de todas as sequências de DNA e RNA disponíveis, onde os pesquisadores depositam as sequências genômicas de bactérias e vírus), RefSeq (diferente do GenBank (onde qualquer um pode depositar), o RefSeq é uma coleção curada de sequências de referência, servindo como o "padrão ouro" para comparação), e Taxonomy (banco de dados que organiza todos os seres vivos em uma árvore filogenética padronizada).

NGS *Next-Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Próxima Geração, representa uma mudança de paradigma na biologia molecular, permitindo o sequenciamento paralelo massivo de milhões de fragmentos simultaneamente.



O

Oligonucleotídeo Um oligonucleotídeo é uma curta sequência sintética de nucleotídeos (blocos construtores de DNA ou RNA) fabricada em laboratório, usada como ferramenta essencial em biologia molecular, pesquisa genética e desenvolvimento de terapias para hibridizar (ligar-se) a sequências específicas de DNA/RNA, auxiliando em testes como PCR, sequenciamento, diagnóstico e terapia gênica.

Oxidase Oxidase é uma enzima que catalisa reações de oxidação-redução, usando oxigênio (O_2) como aceptor de elétrons, reduzindo-o a água (H_2O) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e desempenhando papéis vitais como na respiração celular (citocromo c oxidase) e no sistema imunológico (NADPH oxidase). Em microbiologia, o teste da oxidase identifica bactérias que produzem a enzima citocromo c oxidase, crucial na respiração aeróbica, usando um reagente (TMFD/DMFD) que fica azul-escuro/roxo na presença da enzima, diferenciando aeróbios (positivos, ex: Pseudomonas, Neisseria) de anaeróbios ou facultativos negativos (ex: Enterobacteriaceae) e auxiliando na identificação de bacilos Gram-negativo não fermentadores.



P


Paradoxo da cultivabilidade O paradoxo da cultivabilidade (ou paradoxo do "grande número de células não cultiváveis") é um conceito fundamental na microbiologia que descreve a discrepância entre o número de microrganismos observados em uma amostra ambiental (por microscopia) e o número de microrganismos que realmente crescem em laboratório (cultura).

Parede celular Invólucro rígido externo à membrana citoplasmática bacteriana.

Patógeno bacteriano Bactérias patogênicas são bactérias que podem causar doenças.

Patossistema Patossistema é um termo da fitopatologia que descreve o sistema complexo e dinâmico formado por um patógeno (fungo, bactéria, vírus) e seu hospedeiro (planta), incluindo também os fatores ambientais, que juntos determinam o desenvolvimento de uma doença, sendo fundamental para entender e manejar doenças em culturas agrícolas.


Patovar Patovar (pv.) é um termo da fitopatologia que classifica cepas de uma mesma espécie bacteriana com base na planta hospedeira específica que infectam, indicando sua patogenicidade. É uma subdivisão infraespecífica, como em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cancro cítrico) ou *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (murcha bacteriana do arroz). Essencialmente, um patovar é um grupo de bactérias



que causam doença em um grupo específico de plantas, ajudando a entender a especificidade dos patógenos.

PCR A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que amplifica (cria milhões de cópias) um segmento específico de DNA em laboratório, usando ciclos de aquecimento e resfriamento controlados por um termociclador, uma enzima DNA polimerase e primers, sendo fundamental para diagnóstico médico, medicina forense e pesquisa. O processo envolve desnaturação (separação das fitas de DNA), anelamento (ligação dos primers) e extensão (síntese de novas fitas), resultando em um acúmulo exponencial do DNA alvo.


Peptidoglicano A parede celular Gram-negativo é uma fina camada de peptidoglicano – também chamado de mureína – composto por N-acetilglucosamina (NAG) alternada com açúcares aminados de ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos por ligações β -1,4 com um peptídeo curto composto por L-alanina, ácido D-glutâmico, ácido L-meso-diaminopalméico e D-alanina ligados ao grupo carboxilo do ácido murâmico. Fitas lineares de peptidoglicano são ligadas por ligações amida a fitas adjacentes, com a lipoproteína mureína ancorando a camada à parte interna da membrana externa. Pensa-se que a camada de peptidoglicano de cada bactéria compreende uma única molécula contígua que envelopa o organismo, sendo responsável pela forma e estabilidade osmótica, mas sofrendo constante remodelação à medida que o organismo se alonga e divide. O peptidoglicano fornece integridade estrutural e rigidez à parede celular bacteriana.



Periplasma É o espaço entre a membrana plasmática e a parede celular (ou membrana externa) em bactérias (especialmente Gram-negativo) e outros microrganismos, atuando como uma região gelatinosa que abriga enzimas e proteínas importantes para o transporte de nutrientes, digestão de substâncias tóxicas e regulação osmótica, sendo vital para a sobrevivência celular. Em bactérias Gram-negativo é um espaço proeminente e bem definido entre a membrana interna (plasmática) e a membrana externa; em bactérias Gram-positivo também está presente, mas muito menor, entre a parede celular e a membrana plasmática.

Peritríquio Flagelos espalhados ao longo de toda a superfície celular.


Piocianina É um pigmento azul-esverdeado, solúvel em água, produzido pela bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa*, servindo como um importante marcador de identificação visual e fator de virulência que causa danos teciduais e gera espécies reativas de oxigênio. Sua produção é um sinal clássico de infecção por essa bactéria, especialmente em ambientes clínicos e laboratoriais. É um metabólito secundário produzido exclusivamente por *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria oportunista comum em hospitais e em pessoas com sistema imunológico comprometido ou doenças como fibrose cística. Confere uma cor azul-esverdeada característica a colônias bacterianas e materiais infectados, como pus, e pode fluorescer sob luz UV.



Pioverdina Pioverdina é um sideróforo fluorescente verde-amarelado produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas*, essencial para a captação de ferro (crucial para o metabolismo bacteriano), formação de biofilmes e virulência, e pode ser utilizada em pesquisas de saúde e agricultura, sendo um pigmento chave para identificar essas bactérias, especialmente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Plasma de coelho Bioclin© O Plasma de Coelho Liofilizado Bioclin© é um reagente utilizado in vitro em microbiologia para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*. Ele atua através da prova da coagulase, que detecta a capacidade da bactéria de produzir a enzima coagulase, responsável por converter o fibrinogênio presente no plasma em coágulo (fibrina).

Plasmídeo Um plasmídeo é uma pequena molécula de DNA circular, extracromossômica, que se replica independentemente do DNA principal da célula, sendo comum em bactérias, mas também encontrado em eucariotos unicelulares. Eles carregam genes não essenciais que conferem vantagens adaptativas, como resistência a antibióticos, virulência ou metabolismo de xenobióticos e são cruciais na biotecnologia como vetores para engenharia genética e produção de proteínas, como insulina. Encontram-se no citoplasma das bactérias, separados do cromossomo principal e replicam-se de forma autônoma e independente do cromossomo da célula hospedeira, podendo ter múltiplas cópias por célula.




Porinas Porinas são proteínas transmembranares em forma de barril que formam canais na membrana externa de bactérias Gram-negativo, mitocôndrias e cloroplastos, permitindo a difusão passiva e seletiva de íons e pequenas moléculas, como nutrientes e metabólitos, sendo cruciais para a passagem de substâncias e a resistência bacteriana.

Primer Um primer é um pequeno fragmento de DNA de fita simples, sintético, que se liga a uma sequência-alvo específica no genoma para iniciar processos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou o sequenciamento de DNA, definindo a região a ser amplificada ou analisada, sendo crucial para a especificidade e sucesso de experimentos genéticos, com o desenho ideal a depender de fatores como comprimento, conteúdo de GC (guanina-citosina) e temperatura de fusão.

Q

Quimiotaxia Quimiotaxia é o movimento direcionado de células ou organismos em resposta a um gradiente químico, seja atraídos (quimioatrativos) ou repelidos (quimiorepelentes) por substâncias químicas no ambiente, como nutrientes, toxinas ou sinais de inflamação, essencial para funções como busca de alimento por bactérias e migração de células imunes para infecções.


Quorum sensing (QS) É um mecanismo de comunicação (sinalização celular) entre bactérias, regulando a expressão gênica em resposta a flutuações na densidade da população celular. As bactérias que utilizam o mecanismo QS produzem



e liberam moléculas sinalizadoras químicas chamadas autoindutores que aumentam em concentração em função da densidade celular. Bactérias Gram-positivo e Gram-negativo usam circuitos de comunicação QS para regular uma gama diversificada de atividades fisiológicas. Para que as bactérias usem o mecanismo de comunicação QS constitutivamente, elas devem possuir três habilidades: secreção de uma molécula sinalizadora, secreção de um autoindutor (para detectar a mudança na concentração de moléculas sinalizadoras) e regulação da transcrição gênica como resposta. Este processo é altamente dependente do mecanismo de difusão das moléculas de sinalização. Moléculas de sinalização QS são geralmente secretadas em um nível baixo por bactérias individuais. A baixa densidade celular, as moléculas podem simplesmente se difundir e afastar mas, a alta densidade celular, a concentração local de moléculas sinalizadoras pode exceder o seu limiar de detecção e desencadear alterações na expressão gênica (Miller; Bassler, 2001).

R

Ribossoma O ribossoma é uma organela celular fundamental, presente em todos os seres vivos (procariontes e eucariontes), responsável pela síntese de proteínas, traduzindo a informação do RNA mensageiro (mRNA) em sequências de aminoácidos para formar proteínas essenciais para as funções da célula. Composto por RNA ribossômico (rRNA) e proteínas, ele se divide em uma subunidade maior e uma menor, que se unem para iniciar a tradução, podendo




estar livre no citoplasma ou ligado ao retículo endoplasmático rugoso. A subunidade pequena lê o mRNA e a subunidade grande catalisa a formação das ligações peptídicas. Encontram-se livres no citoplasma (produzem proteínas para uso interno) ou no retículo endoplasmático rugoso (produzem proteínas para exportação ou membranas).

RNA RNA (Ácido Ribonucleico) é uma molécula essencial que atua como "mensageiro" das instruções genéticas do DNA para a produção de proteínas, estruturas vitais para o funcionamento celular, crescimento e reparo de tecidos, sendo composta por uma fita simples de nucleotídeos (fosfato, açúcar ribose e bases A (adenina), U (uracilo), C (citosina), G (guanina)) e existindo em tipos como mRNA, tRNA e rRNA. Intermedia a síntese de proteínas, traduzindo a informação genética do DNA em funções celulares.

S

Sacarose Dissacarídeo (açúcar simples) composto por uma molécula de glicose e uma de frutose.

Saprófita Saprófita (ou saprótrofo/saprófita) refere-se a um organismo, como fungos, bactérias e algumas plantas, que obtém nutrientes decompondo matéria orgânica morta (folhas caídas, animais mortos, etc.), secretando enzimas para quebrar complexos em simples e absorvendo-os, sendo essenciais para a reciclagem de nutrientes e decomposição na natureza. A palavra vem do grego sapos (podre) e phyton (planta).




Semeadura em profundidade (Pour Plate) Técnica microbiológica que envolve misturar uma alíquota de amostra com meio de cultura (como ágar) ainda fundido (cerca de 45-50 °C) em uma placa de Petri, permitindo que o crescimento microbiano ocorra tanto na superfície quanto dentro do meio após a solidificação, sendo usada principalmente para contagem de microrganismos totais e para análises anaeróbicas, embora possa afetar organismos sensíveis ao calor.

Semeadura em superfície (Spread Plate) Técnica microbiológica para espalhar uma amostra líquida (diluída) sobre a superfície de um meio de cultura sólido em uma placa de Petri, usando uma alça de Drigalski, para obter colônias isoladas ou realizar contagem microbiana (UFC/mL), sendo ideal para quantificar microrganismos.

Sideróforo Um sideróforo é uma molécula orgânica produzida por microrganismos (bactérias, fungos) e plantas para captar ferro (Fe^{3+}), um nutriente essencial, mas frequentemente insolúvel e indisponível, secretando-o no ambiente, formando um complexo solúvel e, depois, internalizando-o, sendo fundamental para a sobrevivência em ambientes pobres em ferro.

Solução de iodo A solução de iodo é um reagente fundamental na microbiologia, utilizado principalmente como mordente na coloração de Gram (conhecida como Lugol) para diferenciar bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Ela atua fixando o corante cristal violeta na parede celular bacteriana. O Lugol é composto por iodo (I_2) e iodeto



de potássio (KI) em água. Após a coloração inicial com cristal violeta, o iodo é adicionado para formar um complexo insolúvel (cristal violeta-iodo) dentro da célula. Bactérias Gram-positivo: retêm o complexo violeta-iodo devido à sua espessa camada de peptidoglicano, permanecendo roxas; Bactérias Gram-negativo: perdem o complexo durante a descoloração (álcool/acetona) e são coradas pelo contra-corante (safranina) de rosa/vermelho.

Sorbitol O sorbitol é um poliol (açúcar de álcool).

Stomacher (estomacador) O Stomacher (ou homogeneizador de amostras tipo Stomacher/estomacador) é um equipamento essencial em laboratórios de microbiologia, alimentos, farmacêuticos, cosméticos e ambientais, utilizado para preparar amostras de forma asséptica. Ele homogeneiza o conteúdo selado em um saco plástico descartável por meio de pás que massageiam a amostra, sem contato direto com o equipamento, garantindo segurança contra contaminações.

Svedberg (unidade) A unidade Svedberg (S) é uma medida não métrica para a taxa de sedimentação de partículas em uma centrífuga, indicando velocidade de deposição, não massa exata, pois considera massa, forma e densidade; é definida como 10⁻¹³ segundos e usada em biologia para ribossomos (ex: 70S, 80S), onde a soma das subunidades (como 50S + 30S) não resulta no valor total (70S) devido à sua natureza dependente da velocidade de sedimentação.



T

Tampão Mistura química que permite que uma solução resista a variações de pH.

Tartarato O tartarato é o sal ou éster do ácido tartárico, um composto orgânico que ocorre naturalmente em muitas plantas. A utilização de L-(+)-tartarato (sal do ácido tartárico) por bactérias é um critério taxonômico e bioquímico clássico na microbiologia, especialmente útil para diferenciar membros da família Enterobacteriaceae e patógenos de plantas.

Técnica asséptica Procedimento usado em microbiologia para prevenir a introdução de microrganismos ou vírus em culturas celulares e de tecidos, ou prevenir contaminação cruzada.

Trigonelina A utilização bacteriana de trigonelina (N-metilnicotinato) é um processo bioquímico sofisticado que exemplifica como os microrganismos se adaptam para explorar nichos específicos, como a rizosfera (solo ao redor das raízes) de plantas ricas nesse alcalóide. A capacidade de uma bactéria utilizar trigonelina pode ser testada para fins de classificação taxonômica, utilizando um meio mínimo (utiliza-se um meio de cultura onde a trigonelina é a única fonte de carbono ou nitrogênio). O crescimento bacteriano (turbidez do meio) indica a presença do complexo enzimático necessário para a degradação do alcalóide.



U

Unidades formadoras de colônias (UFC) Unidade Formadora de Colônias (UFC), também conhecida como Colony Forming Unit (CFU) em inglês, é uma medida utilizada em microbiologia para estimar o número de células microbianas viáveis em uma amostra. Uma UFC representa uma célula microbiana que é capaz de se multiplicar e formar uma colônia visível em um meio de cultura sólido sob condições controladas. Em resumo, a UFC é uma unidade de medida que indica o número de microrganismos vivos em uma amostra, que são capazes de se desenvolver e formar colônias quando cultivados em meio de cultura adequado.

Urease Em microbiologia, a urease é uma enzima crucial que hidrolisa a ureia em amônia e dióxido de carbono. A urease é uma metaloproteína dependente de níquel, encontrada em muitas bactérias, fungos, plantas e algas, mas não em animais. O teste da urease é amplamente utilizado para identificar gêneros bacterianos específicos, como *Proteus*, *Klebsiella* e *Helicobacter*. Geralmente utiliza-se o Ágar Ureia de Christensen, com indicador vermelho de fenol. Num resultado positivo o meio muda de amarelo/alaranjado para rosa-choque (devido ao aumento do pH causado pela amônia), enquanto num resultado negativo o meio permanece amarelo.



X

Xantomonadina A xantomonadina é um pigmento amarelo exclusivo, do grupo dos carotenóides bromados, produzido quase exclusivamente por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Esse pigmento é tão característico que dá o nome ao gênero (Xantho vem do grego "amarelo"). Ele não é apenas uma cor, é uma ferramenta biológica essencial para a sobrevivência desses fitopatógenos. Funciona biologicamente como um escudo fotoprotetor, sendo a principal função da xantomonadina proteger a bactéria contra a fotoxidação e a radiação ultravioleta (UV). Permite igualmente a sobrevivência na superfície da folha, pois antes de invadir a planta as *Xanthomonas* vivem como epífitas na superfície das folhas, expostas diretamente à luz solar. A xantomonadina neutraliza ainda o oxigênio singlete, já que a luz solar pode gerar formas reativas de oxigênio (como o oxigênio singlete) que destroem as membranas celulares.



REFERÊNCIAS

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 229-238, 2004. Doi: 10.1016/j.tox.2004.01.030.


BALCÃO, V. M.; AMORIM, L. R. **Biotecnologia – Protocolos Laboratoriais para Ciências da Saúde**. Porto: Fundação Fernando Pessoa Publishers, 2012. ISBN: 978-989-643-092-4.

BALCÃO, V. M. *et al.* Pseudomonas-tailed lytic phages: genome mechanical analysis and putative correlation with virion morphogenesis yield. **Future Microbiology**, v. 17, n. 13, p. 1009-1026, 2022. Doi: 10.2217/fmb-2021-0293.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008. Doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **Int J Food Microbiol.**, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994. Doi: 10.1016/0168-1605(94)90157-0.

BERDY, B. *et al.* In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip. **Nat Protoc.**, v. 12, n. 10, p. 2232-2242, 2017. Doi: 10.1038/nprot.2017.074.



BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria.

Environ Microbiol., v. 7, n. 11, p. 1673-1685, 2005. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x.


BRENNER, D. J. *et al.* **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer New York, NY, 2005. 2. ed. ISBN: 978-0-387-24143-2. Doi: 10.1007/0-387-28021-9.

BYKOWSKI, T. *et al.* Aseptic technique. UNIT 4.1 *In*: CURRENT Protocols Essential Laboratory Techniques. New Jersey: John Wiley, 2012. p. 4.1.1-4.1.12. Doi: 10.1002/9780470089941.et0401s00. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280947477_Aseptic_techniques, Acesso em: 12 oct. 2025.

CAPPUCCINO, J. G.; WELSH, C. **Microbiology**: a laboratory manual, global edition. 11. ed. Pearson Education, 2017. ISBN-10: 9781292175782.

CLAEYS, W. L. *et al.* Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251-262, 2013. Doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.035.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev.**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004. Doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.



CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. **Bacteriophages**: methods and protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions. Humana Totowa Press, NJ, 2009. ISBN: 978-1-58829-682-5. Doi: 10.1007/978-1-60327-164-6.


COLETTA-FILHO, H. D. *et al.* Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **J Appl Microbiol.**, v. 100, n. 2, p. 279-285, 2006. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02787.x.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010. Doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.

CRUMP, R. C. *et al.* Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an Arctic tundra catchment. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1365-1378, 2007. Doi: 10.1890/06-0387.

DALGAARD, P. *et al.* Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **Int J Food Microbiol.**, v. 23, n. 3-4, p. 391-404, 1994. Doi: 10.1016/0168-1605(94)90165-1.

EPSTEIN, S. S. The phenomenon of microbial uncultivability. **Curr Opin Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 636-642, 2013. Doi: 10.1016/j.mib.2013.08.003.



FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006. Doi: 10.1073/pnas.0507535103.

FRANZOSA, E. A. *et al.* Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 111, n. 22, p. E2329-E2338, 2014. Doi: 10.1073/pnas.1319284111.


GANTOIS, I. *et al.* Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 52, n. Pt 2, p. 355-361, 2002. Doi: 10.1099/00207713-52-2-355.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.063.

HARADA, L. K. *et al.* Biotechnological applications of bacteriophages: state of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018. Doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

HARADA, L. K. *et al.* Characterization and *in vitro* testing of newly isolated lytic bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 111-141, 2022. Doi: 10.2217/fmb-2021-0027.



JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007. Doi: 10.1128/JCM.01228-07.


JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006. Doi: 10.1128/AEM.72.3.1719-1728.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7. ed. New York, NY: Springer, 2005. ISBN: 978-0-387-23180-8. Doi: 10.1007/b100840.

JONES, J. B. *et al.* Considerations for using bacteriophages for plant disease control. **Bacteriophage**, v. 2, n. 4, p. 208-214, 2012. Doi: 10.4161/bact.23857.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970. Doi: 10.1094/phyto-60-969.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002. Doi: 10.1080/0735-260291044377.



LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Appl Environ Microbiol.**, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994. Doi: 10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994.


MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 16. ed. Hoboken, NJ: Pearson Education, 2021. ISBN: 9780134874401.

MARCOLEFAS, E.; LEUNG, T.; OKSHEVSKY, M.; MCKAY, G.; HIGNETT, E.; HAMEL, J.; AGUIRRE, G.; BLENNER-HASSETT, O.; BOYLE, B.; LÉVESQUE, R. C.; NGUYEN, D.; GRUENHEID, S.; WHYTE, L. Culture-dependent bioprospecting of bacterial isolates from the canadian high arctic displaying antibacterial activity. **Front Microbiol.**, v. 10, n. 1836, 2019. Doi: 10.3389/fmicb.2019.01836.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol.**, v. 55, p. 165-199, 2001. Doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371-394, 1949. Doi: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.

NABERGOJ, D.; MODIC, P.; PODGORNIK, A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. **MicrobiologyOpen**, v. 7, n. 2, p. e00558, 2018. Doi: 10.1002/mbo3.558.



NICHOLS, D. *et al.* Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n. 15, p. 4889-4897, 2008. Doi: 10.1128/AEM.00393-08.


OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005. Doi: 10.1089/fpd.2005.2.115.

OPINA, N. *et al.* A Novel Method for Development of Species and Strain-Specific DNA Probes and PCR Primers for Identifying *Burkholderia solanacearum* (Formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 5, p. 19-30, 1997.

PARK, Y. J. *et al.* Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. **Microbiol Res.**, v. 159, n. 4, p. 419-423, 2004. Doi: 10.1016/j.micres.2004.09.002.

QUAINOO, S. *et al.* Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 30, n. 4, p. 1015-1063, 2017. Doi: 10.1128/CMR.00016-17. *Erratum in:* **Clin Microbiol Rev.**, v. 31, n. 1, p. e00082-17, 2017. Doi: 10.1128/CMR.00082-17.

QUIGLEY, L *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013. Doi: 10.1111/1574-6976.12030.



RIOS, A. C *et al.* M. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. **Microbiological Research**, v. 191, p. 51-80, 2016. Doi: 10.1016/j.micres.2016.04.008.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, p. e3064, 2012. Doi: 10.3791/3064.


SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011. Doi: 10.3201/eid1701.p11101.

SILVA, E. C. *et al.* Control of coffee canker associated with *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* using a cocktail integrating two virulent polyvalent bacteriophages encapsulated in nanoparticles: in planta studies. **J Appl Microbiol.**, v. 136, n. 1, p. lxae310, 2025. Doi: 10.1093/jambio/lxae310.

STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **J Bacteriol.**, v. 194, n. 16, p. 4151-4160, 2012. Doi: 10.1128/JB.00345-12.

TALLON, P. *et al.* Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 166, p. 139-166, 2005. Doi: 10.1007/s11270-005-7905-4.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol.**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002. Doi: 10.1016/s1369-5274(02)00324-7.



TORTORA, G. *et al.* **Microbiology**: an introduction, global edition. 13. ed. Pearson, 2020. ISBN-10: 1292276266.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 38, n. 4, p. 761-778, 2014. Doi: 10.1111/1574-6976.12062.

VERDIER, V. *et al.* Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. **Plant Pathology**, v. 47, n. 5, p. 601-608, 1998. Doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00271.x.

ZHAO, X. *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. **J. Microbiol Biotechnol.**, v. 24, n. 3, p. 297-312, 2014. Doi: 10.4014/jmb.1310.10013.

SOBRE OS AUTORES



Victor Manuel Cardoso Figueiredo

Balcão desde outubro de 2013 é Professor da Universidade de Sorocaba (Uniso), onde também lidera o Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab). É Bolsista de Produtividade em Pesquisa PQ-2 do CNPq (Brasil), embaixador do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da

Universidade de Aveiro (Portugal), licenciado em Engenharia Alimentar pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB-UCP) e Doutor em Biotecnologia também pela ESB-UCP (grau de Doutor reconhecido pela FCF-USP (São Paulo, Brasil), certificado registrado sob o número 116247 nos termos do Artigo 48 da Lei 9394/96). Pós-Doutor em Engenharia Enzimática (visando coimobilização de duas enzimas multiméricas para o tratamento extracorpóreo de leucemia) e em Microbiologia Aplicada (visando o tratamento do cancro bacteriano da planta do kiwi utilizando bacteriófagos líticos contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). Pesquisas de interesse: biologia e biotecnologia de bacteriófagos; estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas (com ênfase em partículas bacteriofágicas); desenvolvimento de sistemas inovadores não-invasivos para entrega de entidades proteicas (com ênfase na via transdérmica).



Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Farmacêutica Bioquímica formada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, e em Farmácia Industrial pela PUC-Campinas. Mestre em Tecnologia de Alimentos e doutora em Química Analítica, pela Unicamp. É docente na Universidade de Sorocaba (Uniso), no curso de Farmácia e nos Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e em Processos Tecnológicos e Ambientais. Desenvolve pesquisas voltadas ao controle de qualidade físico-químico de fármacos e medicamentos, à otimização de formulações farmacêuticas e aos sistemas de liberação controlada de fármacos. Seu trabalho também abrange a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas, com foco em bacteriófagos.



Lucas Mateus Rivero Rodrigues

Engenheiro Agrônomo pelo Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL), com formação voltada à fitossanidade, especialmente ao isolamento e identificação de bactérias fitopatogênicas, por meio de métodos convencionais e moleculares. Mestre em Proteção de Plantas pela UNESP-Botucatu, com ênfase em fitobacteriologia. Doutor em Agricultura Tropical e Subtropical pelo Instituto Agronômico (IAC), na área de Genética, Melhoramento e Biotecnologia Vegetal. Sua pesquisa atual concentra-se no desenvolvimento de

cultivares de cafeeiro resistentes a bactérias fitopatogênicas, bem como em estratégias de manejo integrado de bacterioses do cafeeiro. É professor Adjunto I na Universidade de Sorocaba (Uniso), onde leciona Fitossanidade de Culturas Tropicais e áreas correlatas, contribuindo para a formação de profissionais comprometidos com a integração entre sustentabilidade e sanidade vegetal.



Fernando de Sá Del Fiol Pró-Reitor de Graduação, Assuntos Estudantis e Extensão (PROGRADE) da Universidade de Sorocaba (Uniso), da qual exerceu o cargo de Reitor por dois mandatos (2010-2014 e 2014-2018). É professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências

Farmacêuticas na Uniso. Farmacêutico, com graduação em 1990. Mestre, Doutor e Pós-Doutor em Farmacologia na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Em 2009 e 2011 fez aperfeiçoamento em Doenças Infecciosas na Universidade de Harvard (EUA). Foi, de 2006 a 2012, membro da Comissão Técnica de Acompanhamento da Avaliação (CTAA) do Ministério da Educação (MEC), instância máxima de acompanhando da avaliação de Cursos de graduação e de Instituições de Ensino Superior. Em sua carreira acadêmica, publicou 78 artigos em periódicos especializados, 46 capítulos de livros e 2 livros. É revisor de dez periódicos internacionais. Orientou 15 dissertações de mestrado e uma de doutorado. Atua na área de

Farmacologia, com ênfase em Uso Racional de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana.

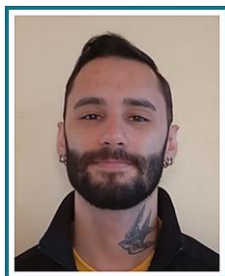


Lucas Navarro Formando em Design pela Universidade de Sorocaba (Uniso), tem sua base no desenho e mídias tradicionais. Apaixonado pelo universo criativo desde pequeno, colhe suas referências na cultura pop: músicas, séries, filmes, mas sempre respeitando e fazendo bom uso dos ensinamentos de grandes mestres da pintura clássica. Explorando as diversas áreas que o nicho da ilustração oferece, trabalhou no ramo editorial ilustrando livros infantis, dentre eles "Alface, o Jacaré Vegetariano" e "Lá na Minha Escola" ambos pela Editora Casa. Como animador 2D, trabalhou no curta "Novas Formas de Pensar Amor", viabilizado pela Lei Paulo Gustavo, e atuou como tatuador por um curto período também. Atualmente, trabalha no ramo da Arte Sacra ilustrando e criando projetos para vitrais de igrejas, fazendo sua transição de carreira para a área do Design.



Alessandro Marques dos Santos Biólogo formado pela Universidade Paulista (UNIP), atualmente, é mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade de Sorocaba (Uniso). Após a graduação, realizou Iniciação Científica no Instituto Adolfo Lutz (IAL), com

Bolsa de Iniciação Científica concedida pela FAPESP (ref. # 2019/21361-8), com foco na análise e caracterização de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos (MDR). Atualmente, dedica-se à pesquisa com bacteriófagos líticos aplicados ao combate de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, por meio da terapia fágica, no Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab-Uniso).



André Ruiz Marra André Ruiz Marra é licenciado e biólogo pela Universidade de Sorocaba (Uniso). Desde a graduação, atua na área da fitossanidade, tendo sido bolsista de extensão por dois anos durante esse período. Seus estudos concentraram-se em agroecossistemas, com ênfase na ecologia

de insetos-praga e no isolamento e caracterização de um bacteriófago lítico aplicado ao controle da mancha bacteriana do maracujazeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Atualmente, desenvolve trabalhos de pesquisa relacionados com o isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para o biocontrole da bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana do tomateiro, no Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab-Uniso).



Júlio Cesar Mescoloto Formado em Biomedicina no ano de 2022, prosseguiu para suas primeiras especializações nas áreas de hematologia e parasitologia clínica. Atua como biomédico em laboratório de análises clínicas e, nos períodos noturnos, atua como tutor e dá

aulas de laboratório para alunos de graduação de cursos semipresenciais. Seu maior interesse, desde a graduação, era ingressar no meio acadêmico e seguir para a área da docência. No ano de 2025 conseguiu uma bolsa em um programa de Pós-Graduação Strictu Senso na Universidade de Sorocaba (Uniso), no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-Uniso), para desenvolver projeto de pesquisa na área da microbiologia, focado em bacteriófagos e terapia bacteriofágica, no Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab-Uniso).



Bruna Caroline Alves Nogueira Desde muito jovem, sempre sonhou em tornar-se médica veterinária, mesmo tendo pouco contato com animais além daqueles que conhecia na casa da sua avó. Iniciou a graduação com o desejo de atuar com animais exóticos e, ao longo do curso, seu interesse voltou-se para os felinos selvagens. Formou-se em meio à pandemia de COVID-19 e,

logo em seguida, iniciou uma Pós-Graduação em Análises Clínicas Veterinárias, dando início à sua trajetória na bancada laboratorial. No entanto, sua curiosidade científica e

interesse pela pesquisa a impulsionaram a ir mais além. Assim, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais (PPGPTA-Uniso), no VBlab–Uniso, com foco em virologia e bacteriologia. Seu objetivo é aprimorar continuamente a atuação na área laboratorial e contribuir, por meio da ciência, para a melhoria da saúde pública.



Renata Lopes Simões da Silva Possui formação em Medicina Veterinária, pela Universidade de Sorocaba (2021), tendo realizado Iniciação Científica na área de resistência bacteriana. Tem formação em Infectologia Veterinária (2023), com foco em Controle de Infecções Hospitalares e atua na área acadêmica, como professora de cursos técnicos de Auxiliar Veterinário. Atualmente é mestranda no Programa de Pós-graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais (PPGPTA-Uniso) no Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab-Uniso), com foco no estudo de bactérias do gênero *Salmonella* e bacteriófagos para seu controle.



UNISO

(Filiada à Associação Brasileira das Universidades Comunitárias - ABRUC)

Missão da Universidade de Sorocaba

“Ser uma Universidade Comunitária que, por meio da integração de ensino, pesquisa e extensão, produza conhecimentos e forme profissionais, em Sorocaba e região, para serem agentes de mudanças sociais, à luz de princípios cristãos”.

www.uniso.br