

# Método de isolamento e detecção de Micro-organismos

Gabriel Padilla  
gpadilla@icb.usp.br

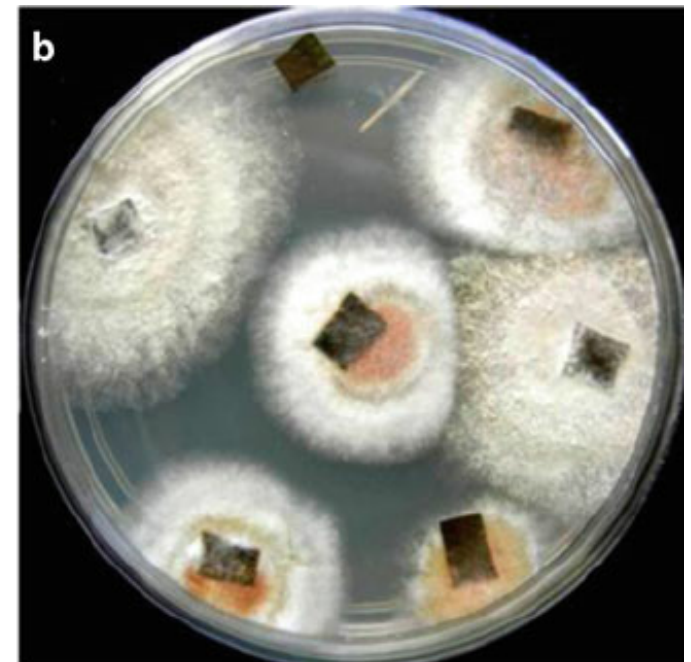
2020

# Isolamento de Micro-organismos

- ☀ O isolamento de micro-organismos permite quantificar e identificar membros de uma comunidade microbiana
- ☀ O tipo de ambiente a ser avaliado interfere na estratégia para obter a suspensão de células
  - ❖ O solo deve ser agitada em solução tampão
  - ❖ Para remoção da comunidade microbiana de superfícies, as amostras devem ser agitadas em solução contendo pérolas (bolinhas) de vidro.
  - ❖ Compostos surfactantes (p.e. Tween 80) podem ser utilizados para facilitar a dispersão
- ☀ Diluições ou concentração de amostras podem ser necessárias.
  - ❖ Para amostras de solo, diluições apropriadas são necessárias.
  - ❖ Para amostras de água e ar, podem ser utilizados filtros para concentrar as células das amostras

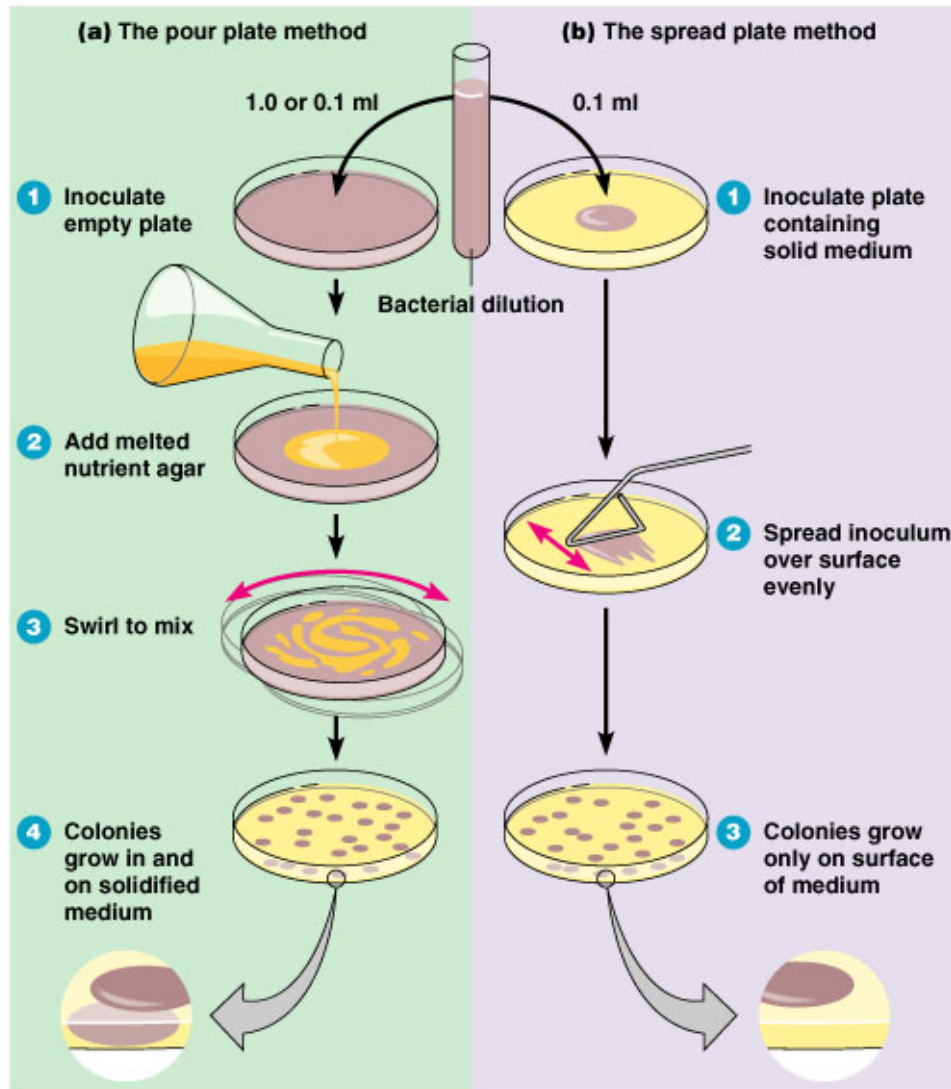
# Isolamento de Micro-organismos

- ✱ Seletividade dos meios de cultivo permite avaliar e isolar grupos microbianos específicos – substratos específicos e corantes
- ✱ O número de colônias deve estar entre 30 e 300 UFC.g de amostra<sup>-1</sup>. ou permitir a observação de colônias isoladas



# Isolamento de Micro-organismos

## Método de semeadura em Placa de Petri



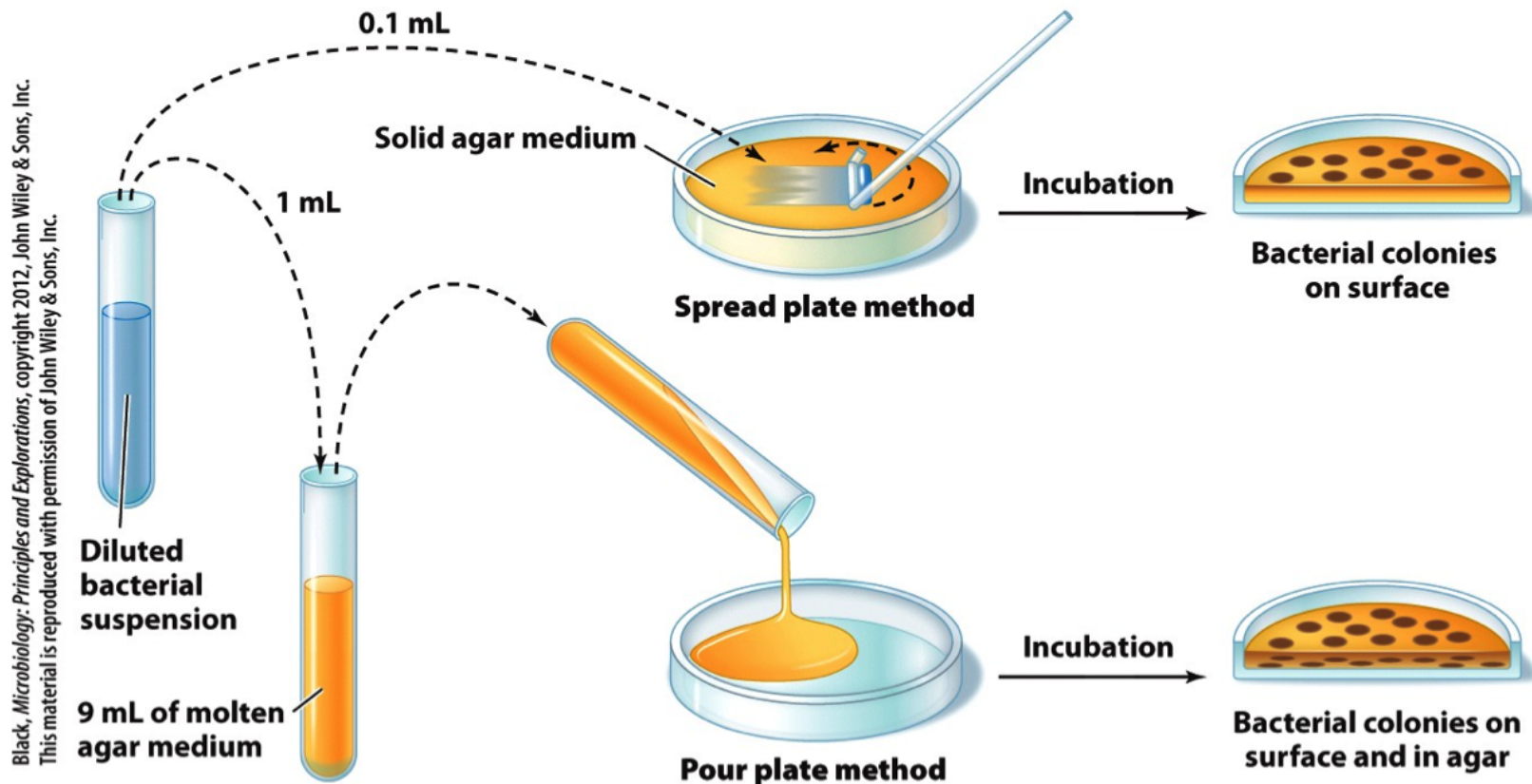
Método da Sobrecamada  
Meio de cultura  
sobre as células

Método de espalhamento  
sobre o meio de cultura

# Isolamento de Micro-organismos

## Método de semeadura em Placa de Petri

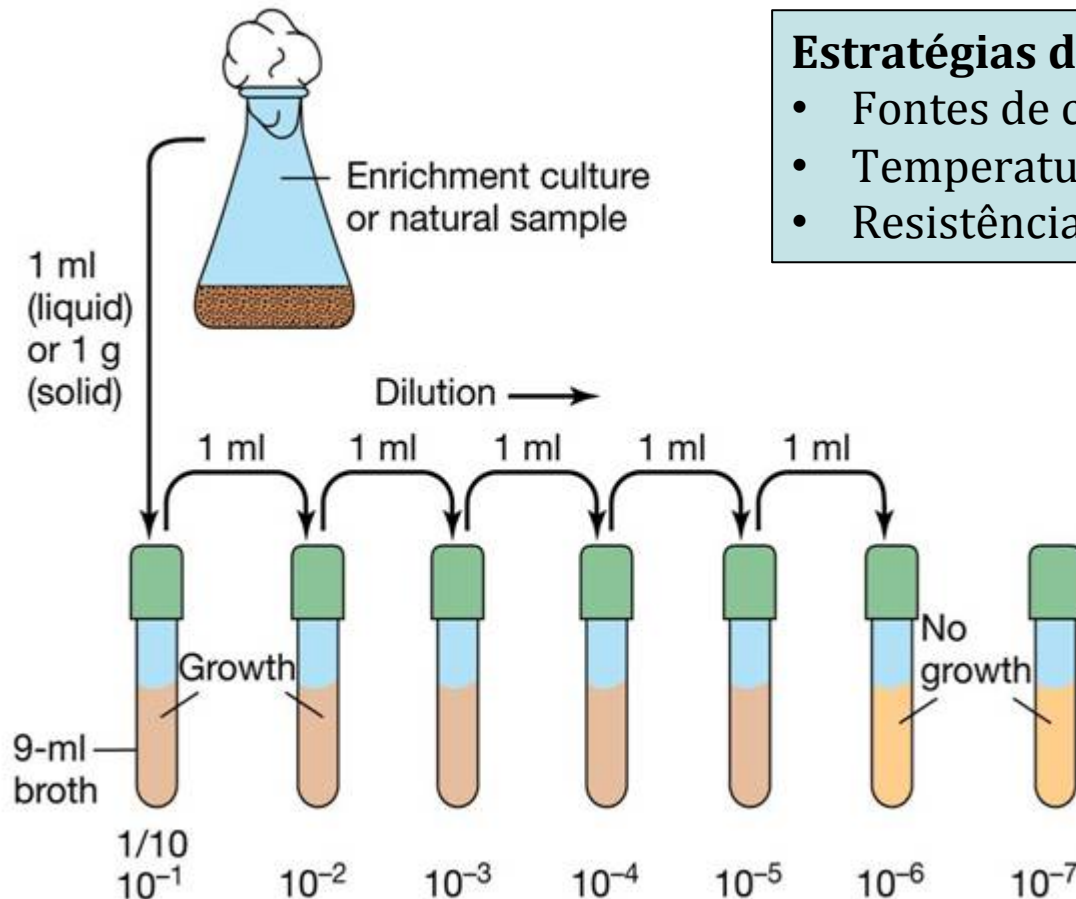
Método de espalhamento - sobre o meio de cultura



Método da Sobrecamada - Células no Meio de cultura

# Isolamento de Micro-organismos

## Método de enriquecimento



### Estratégias de enriquecimento:

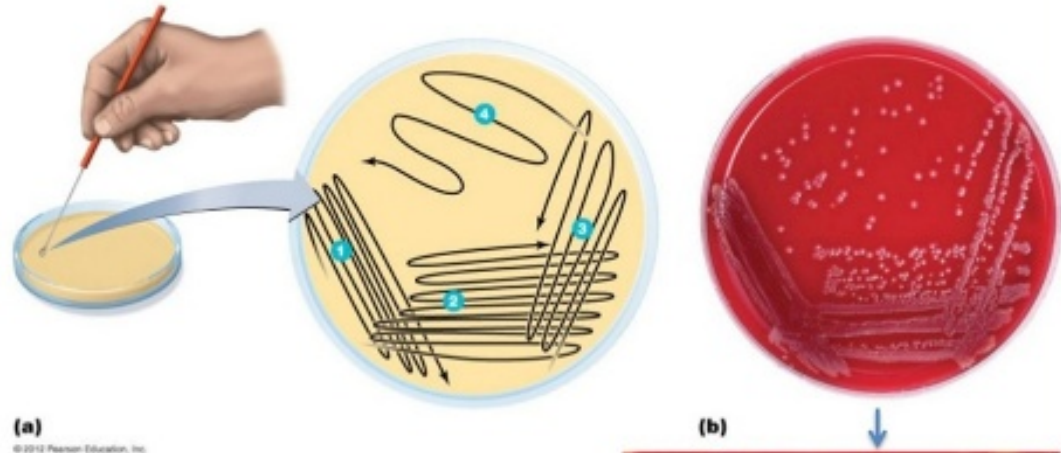
- Fontes de carbono
- Temperatura
- Resistência a fatores físico-químicos e etc



# Purificação de micro-organismos em meio de cultura

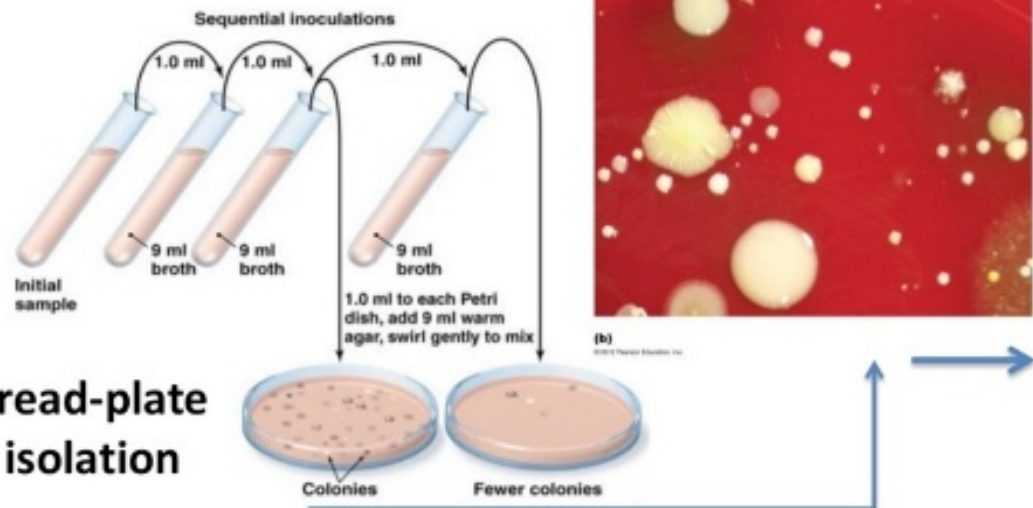
## Techniques to isolate microorganisms in pure cultures or axenic cultures

- Streak-plate technique of isolation



- The method of serial dilutions

- Pour-plate/spread-plate techniques of isolation



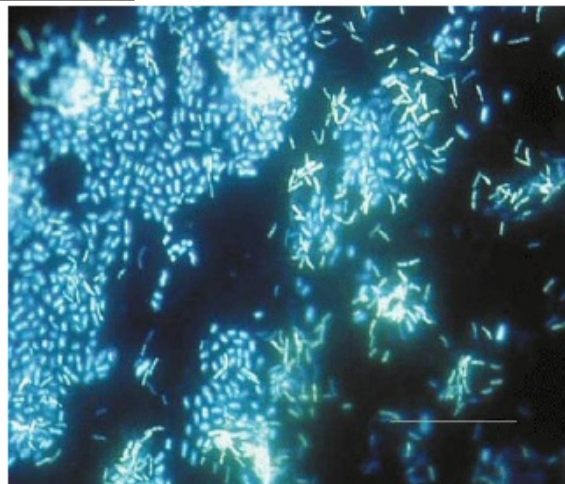
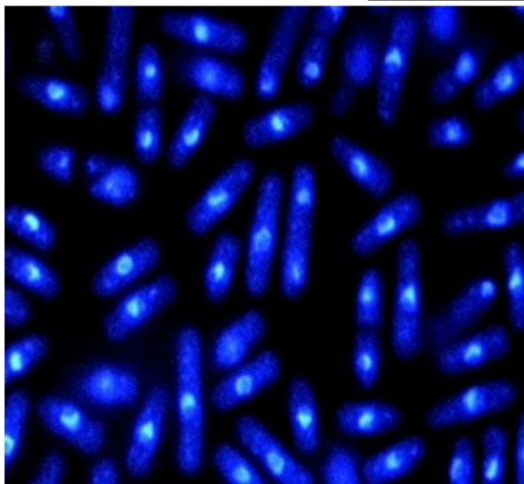
# Detecção de Micro-organismos

## Método de coloração por DAPI ou Acridina Laranja (AO)

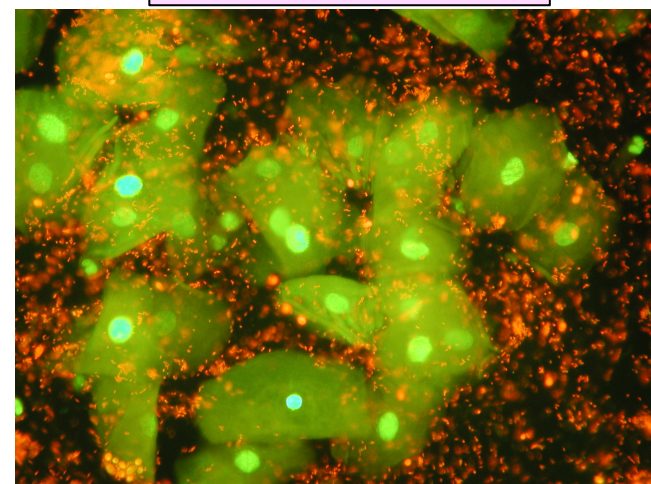
### Estratégias:

- DAPI (diamidino-2-phenylindole) cora as células de azul fluorescente
- AO cora de laranja ou laranja esverdeado
- Fluorescência é observada sobre Luz U.V.
- Permitem a quantificação de micro-organismos ao microscópio de fluorescência.
- São inespecíficos pois coram os ácidos nucleicos
- Não permite diferenciar células vivas de células mortas

DAPI



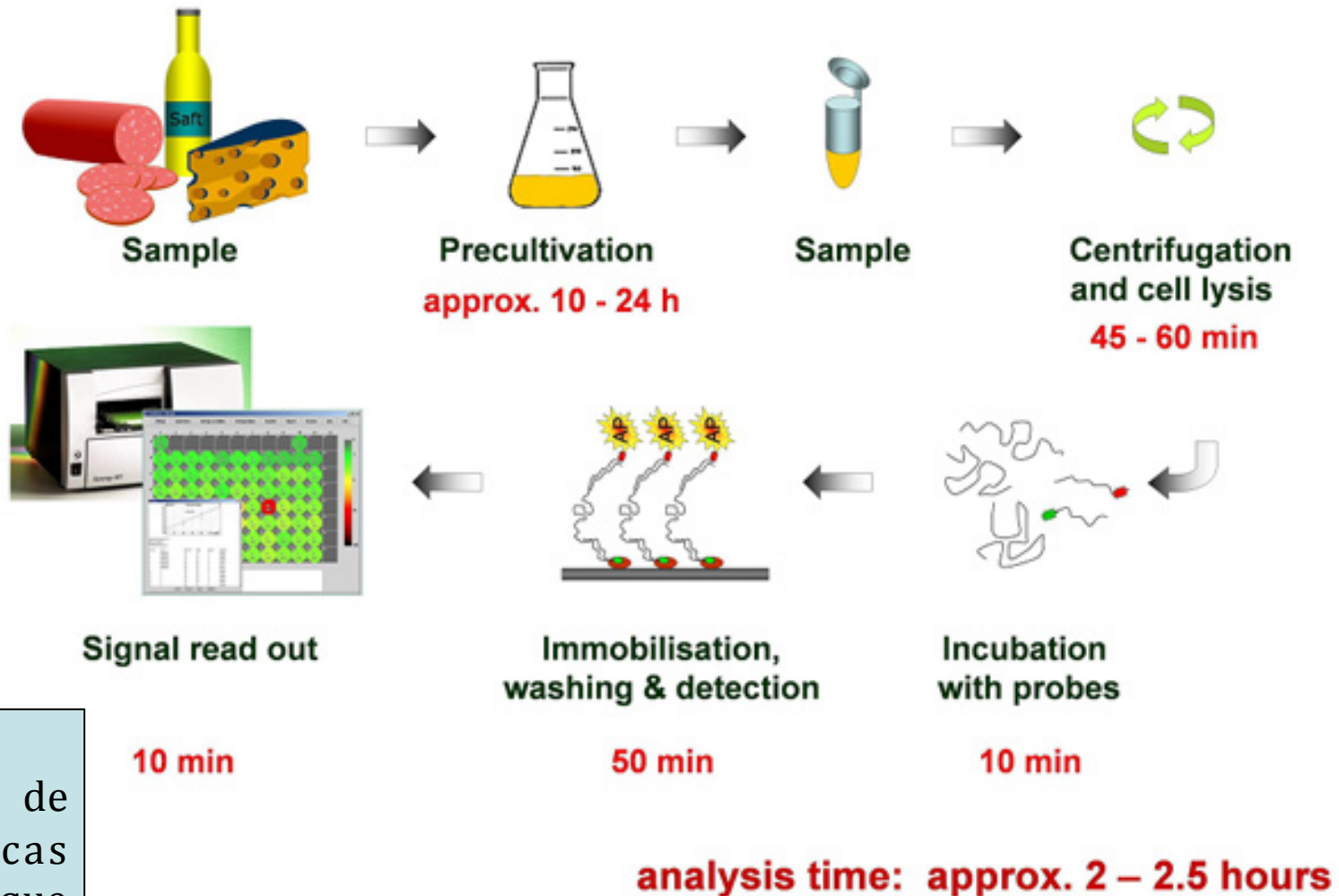
Acridina Laranja





# Detecção de Micro-organismos

## Hibridização com sondas

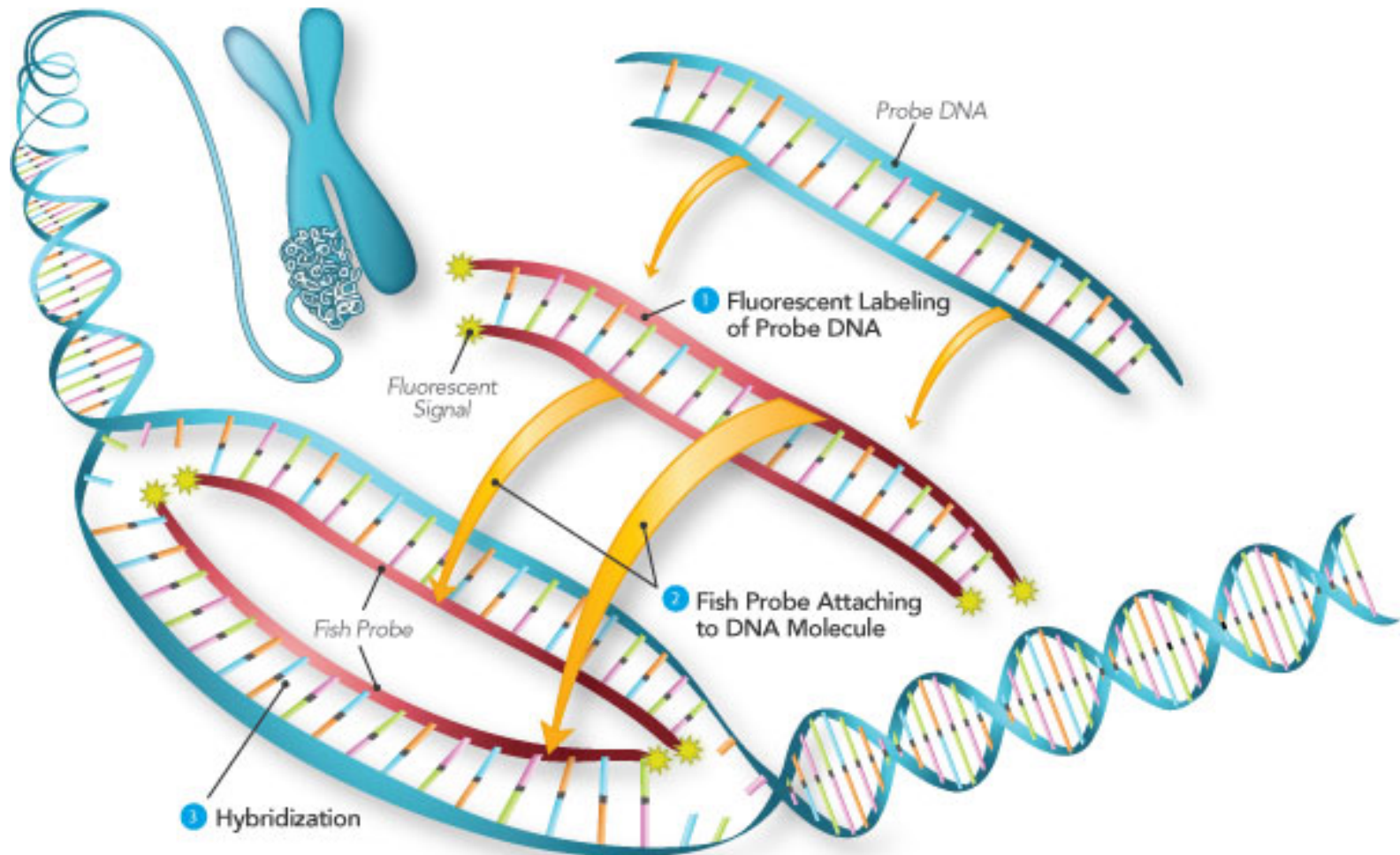


### Estratégias:

- Utiliza sondas de DNA específicas para os grupos que se quer detectar

# Detecção de Micro-organismos

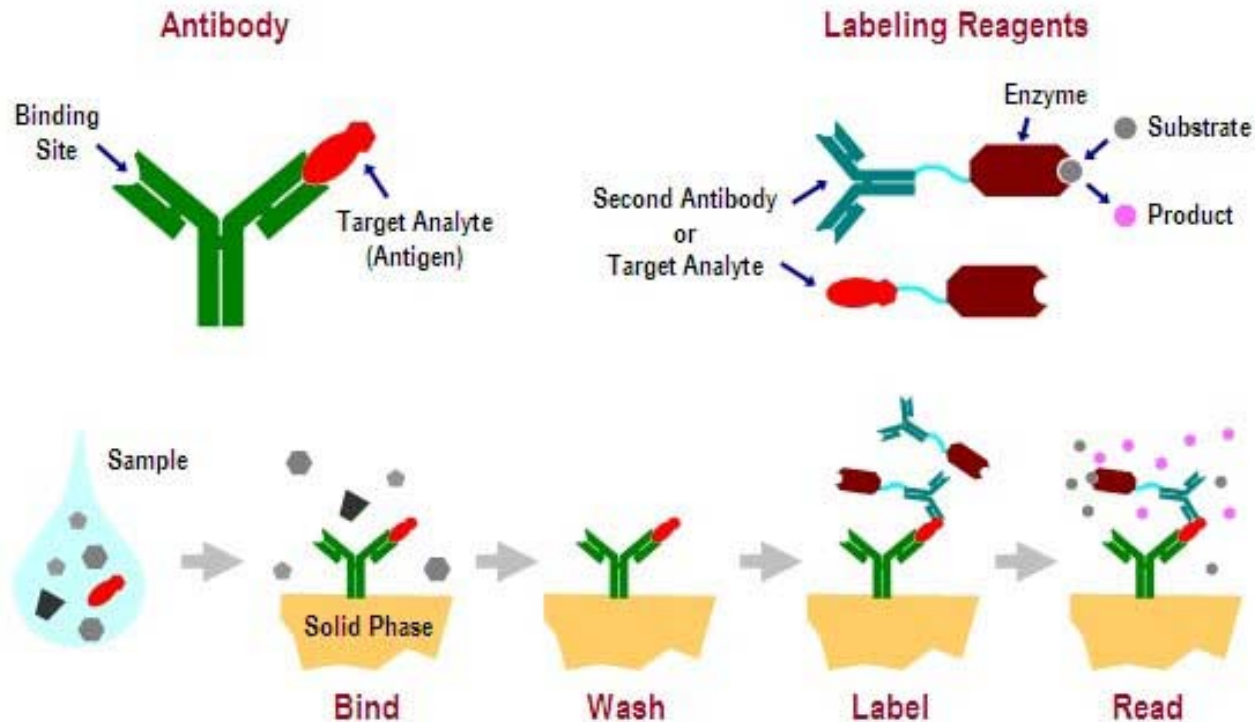
## Hibridização com sondas



# Detecção de Micro-organismos

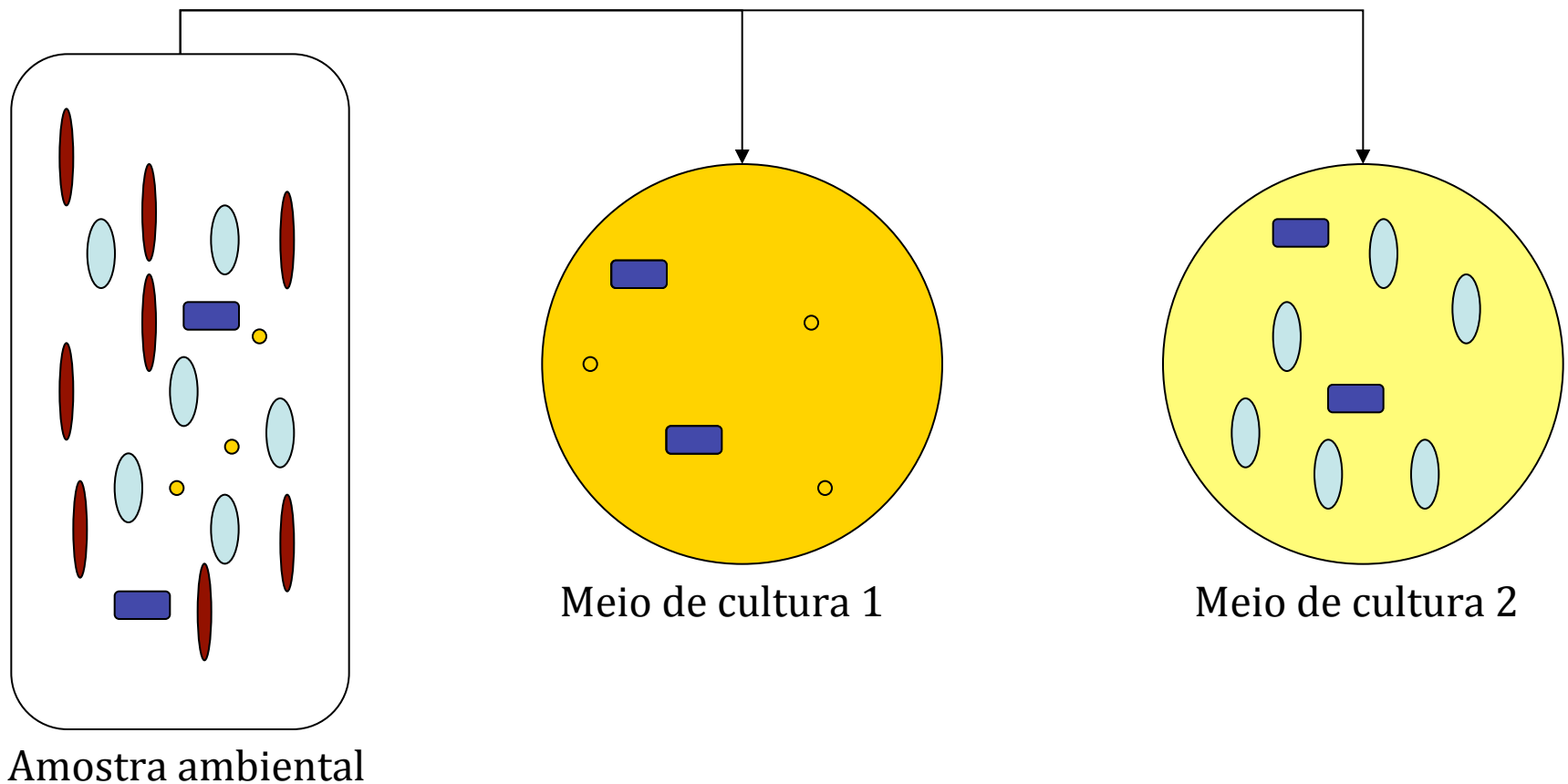
## Método imunológico - anticorpos

### ELISA



# Culturabilidade dos Micro-organismos

## Inconsistência entre o observado e o isolado



## Inconsistência entre a Diversidade observada e a isolada

- ✱ Baixa culturabilidade microbiana
- ✱ Seletividade dos meios de cultivo
- ✱ Seletividade das condições de cultivo: CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, temperatura, fonte de C, N e etc.
- ✱ Pequena representatividade da comunidade *in vivo* (coleções de culturas)

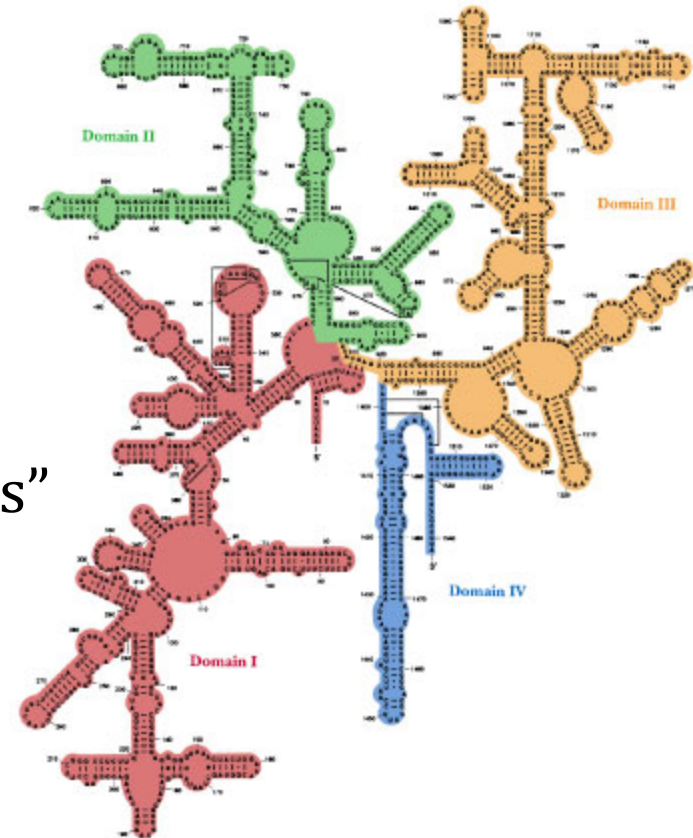


# Métodos Independentes de Cultivo

## Análise da comunidade microbiana não Cultiváveis

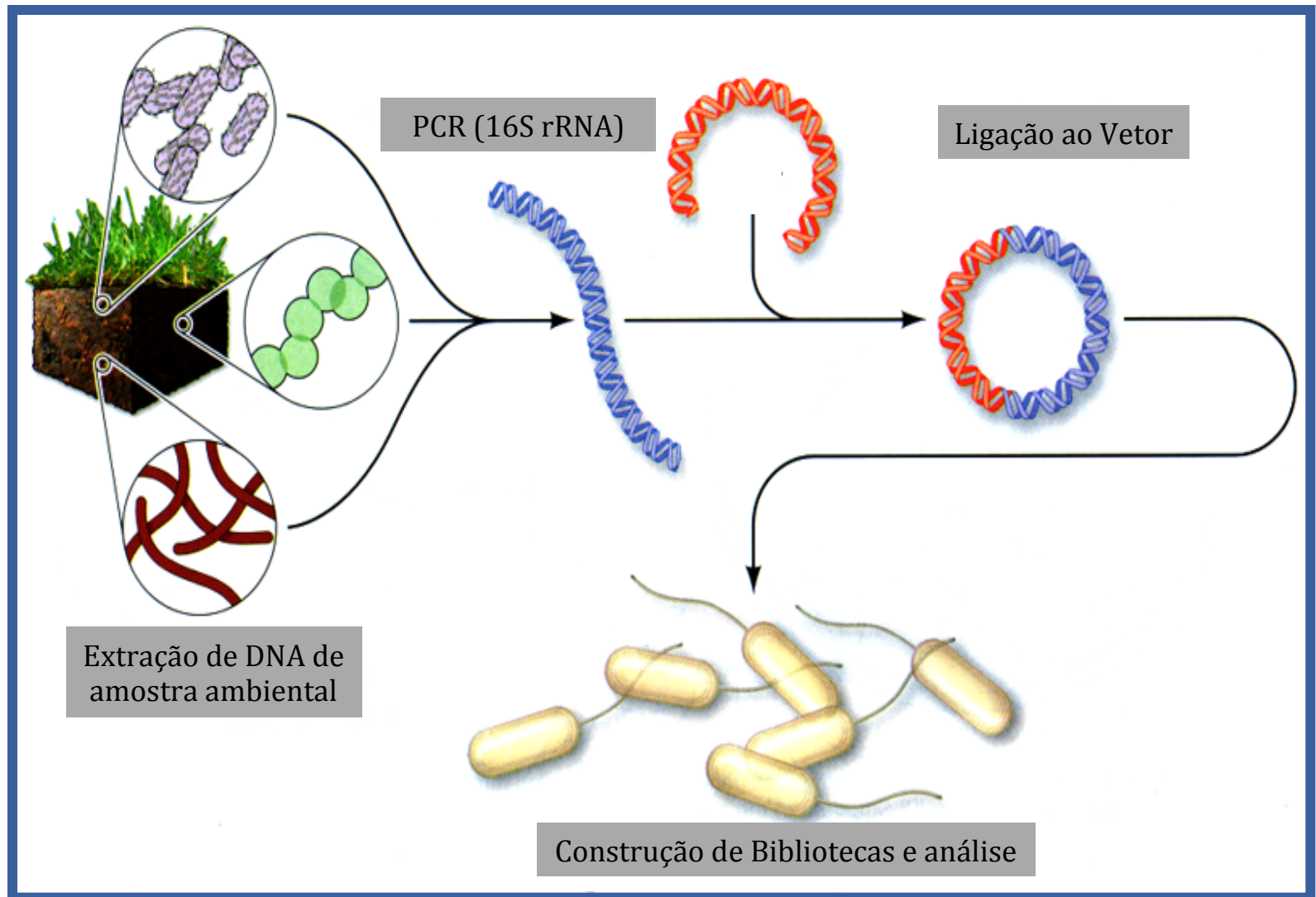
☀ Genes Conservados (ribossomais, girase, RNA polimerase)

- Presente em todas as espécies
- Regiões variáveis e conservadas
- Permite o uso de *primers* “universais”



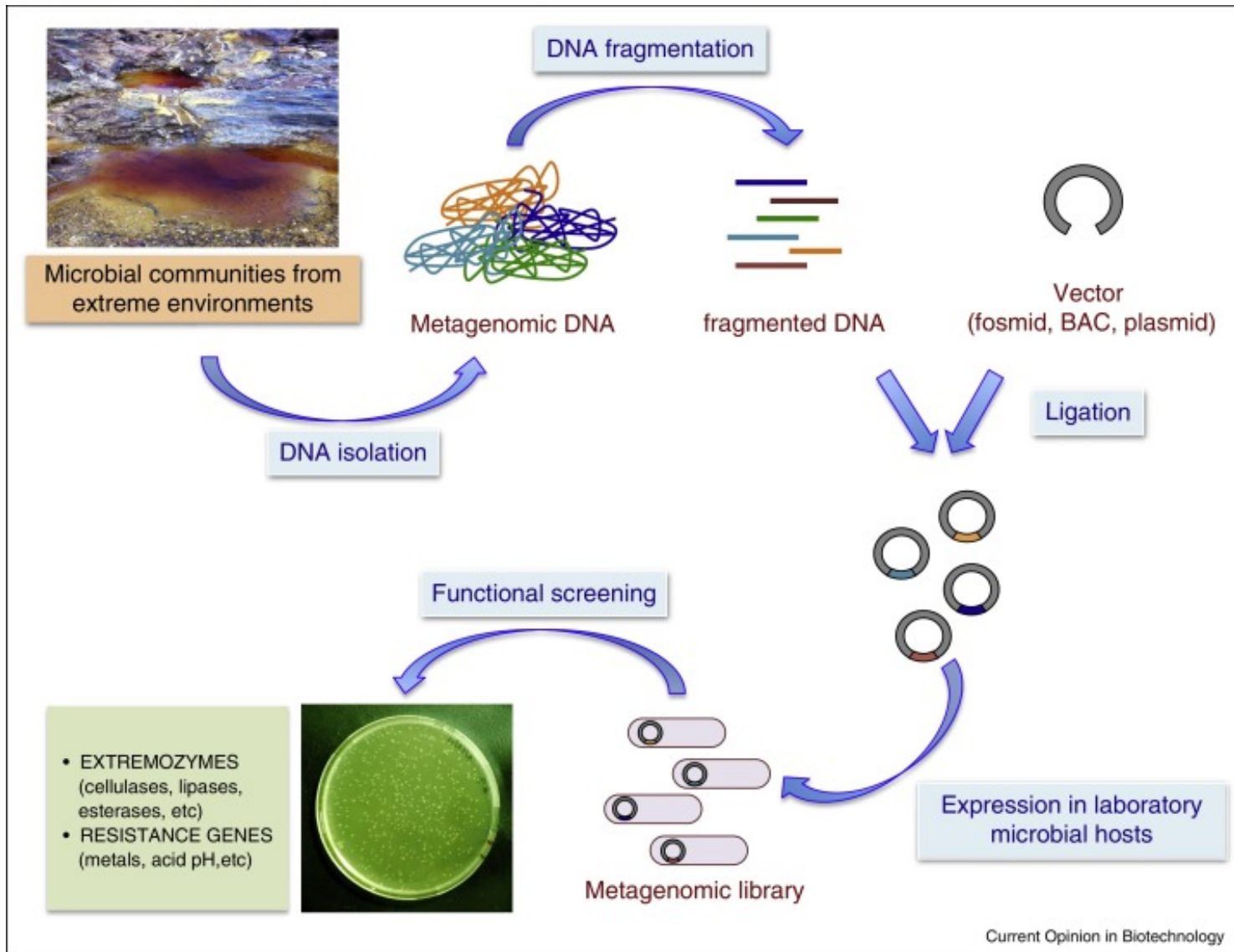
# Métodos Independentes de Cultivo

## Bibliotecas de Clones

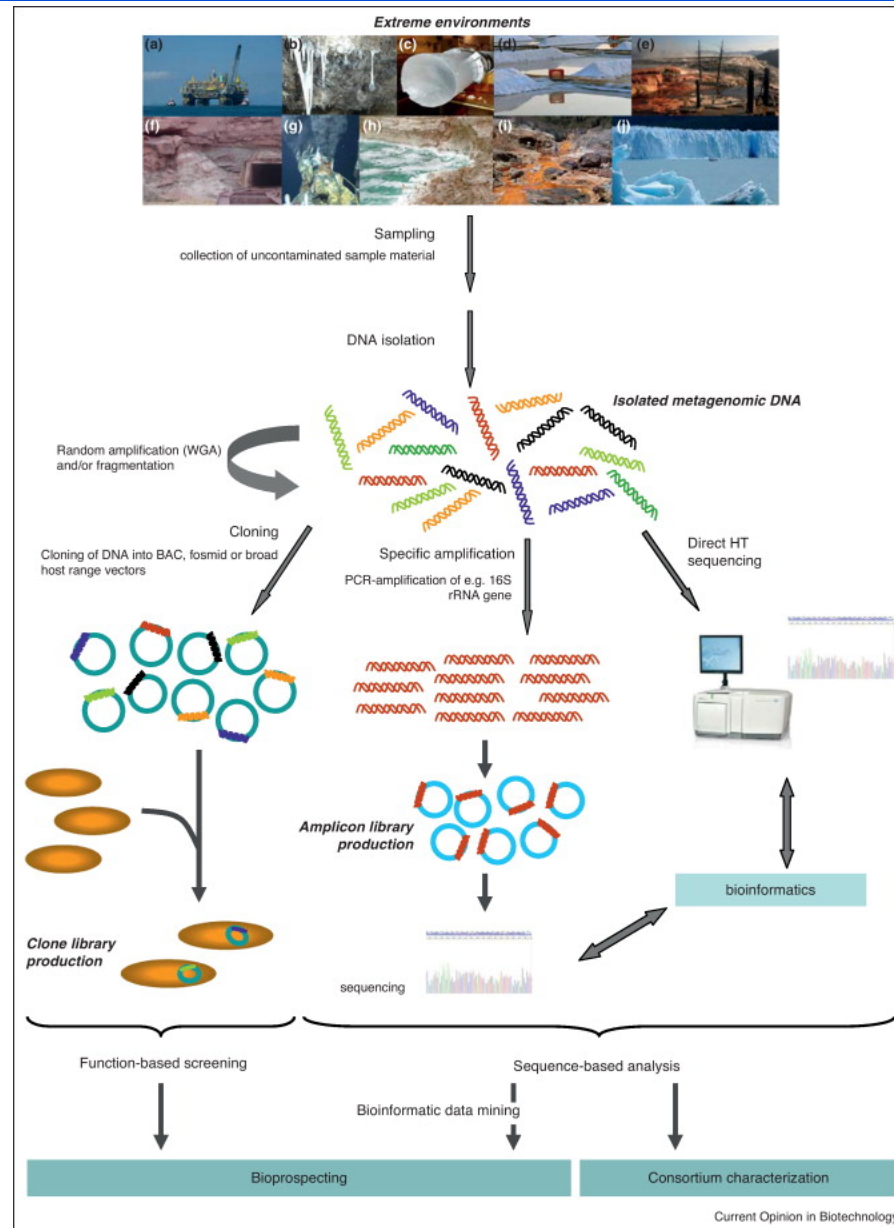


# Métodos Independentes de Cultivo

## Biblioteca de clones funcionais

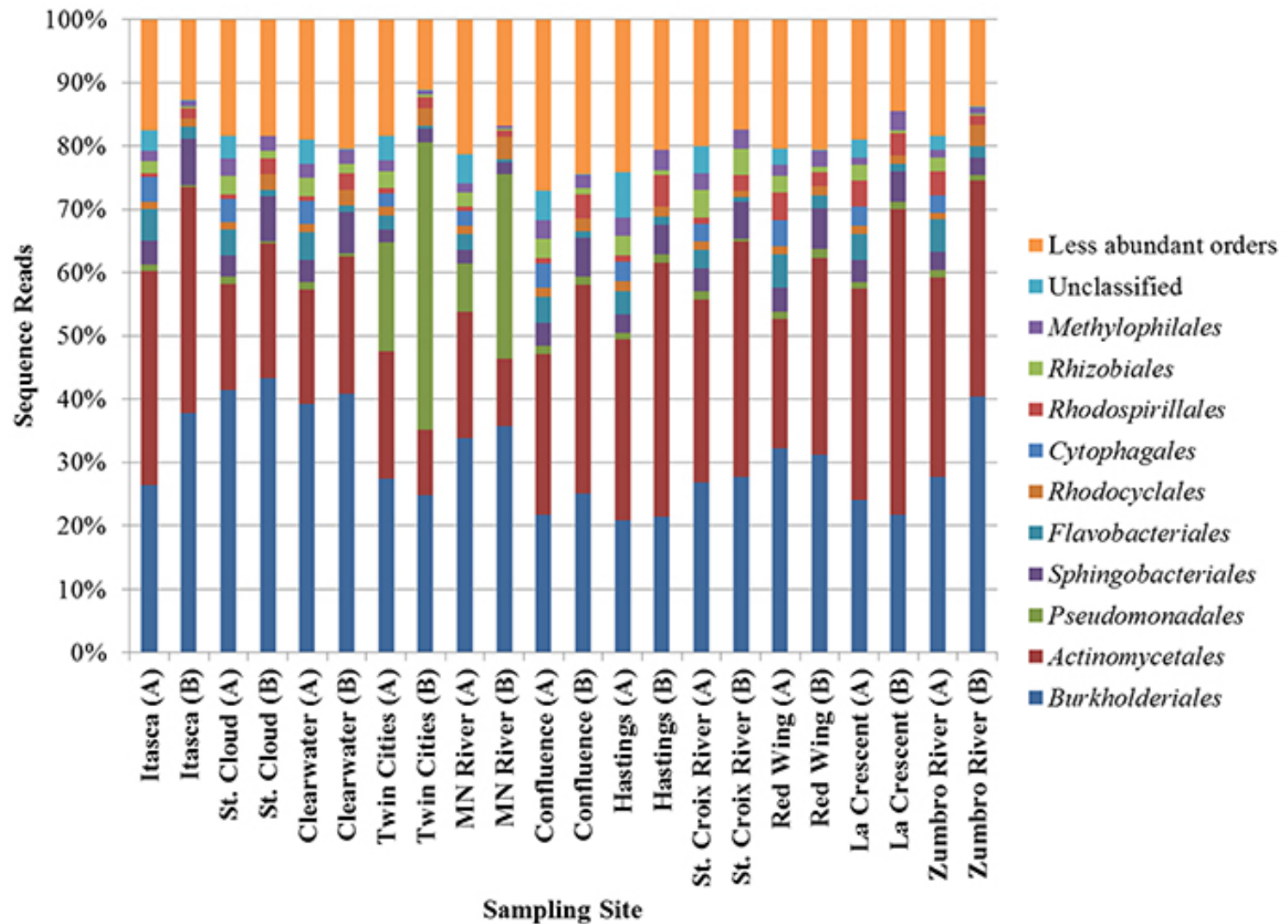


# Métodos Independentes de Cultivo - Metagenoma



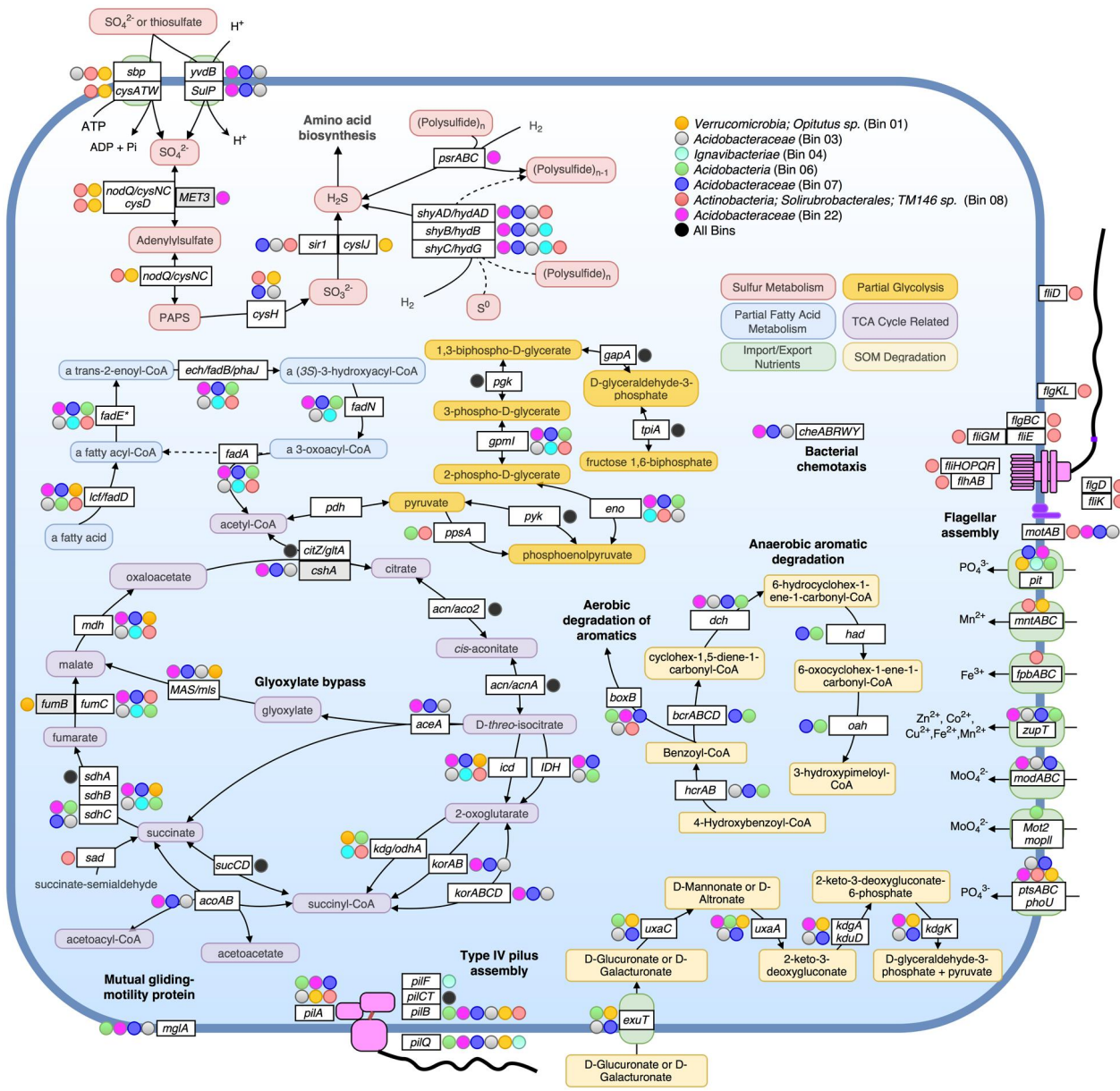
# Métodos Independentes de Cultivo

## Diversidade



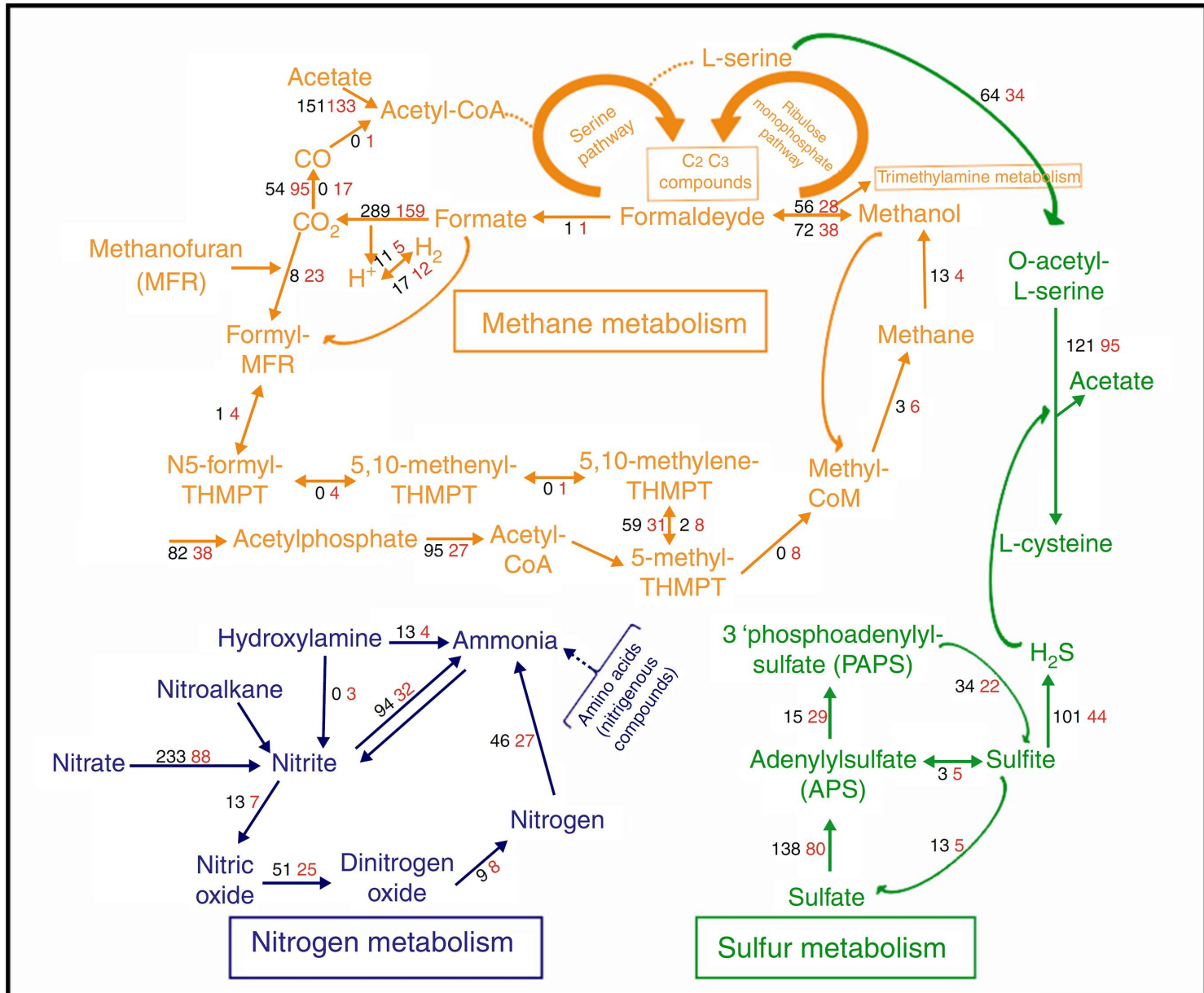


# Métodos Independentes de Cultivo

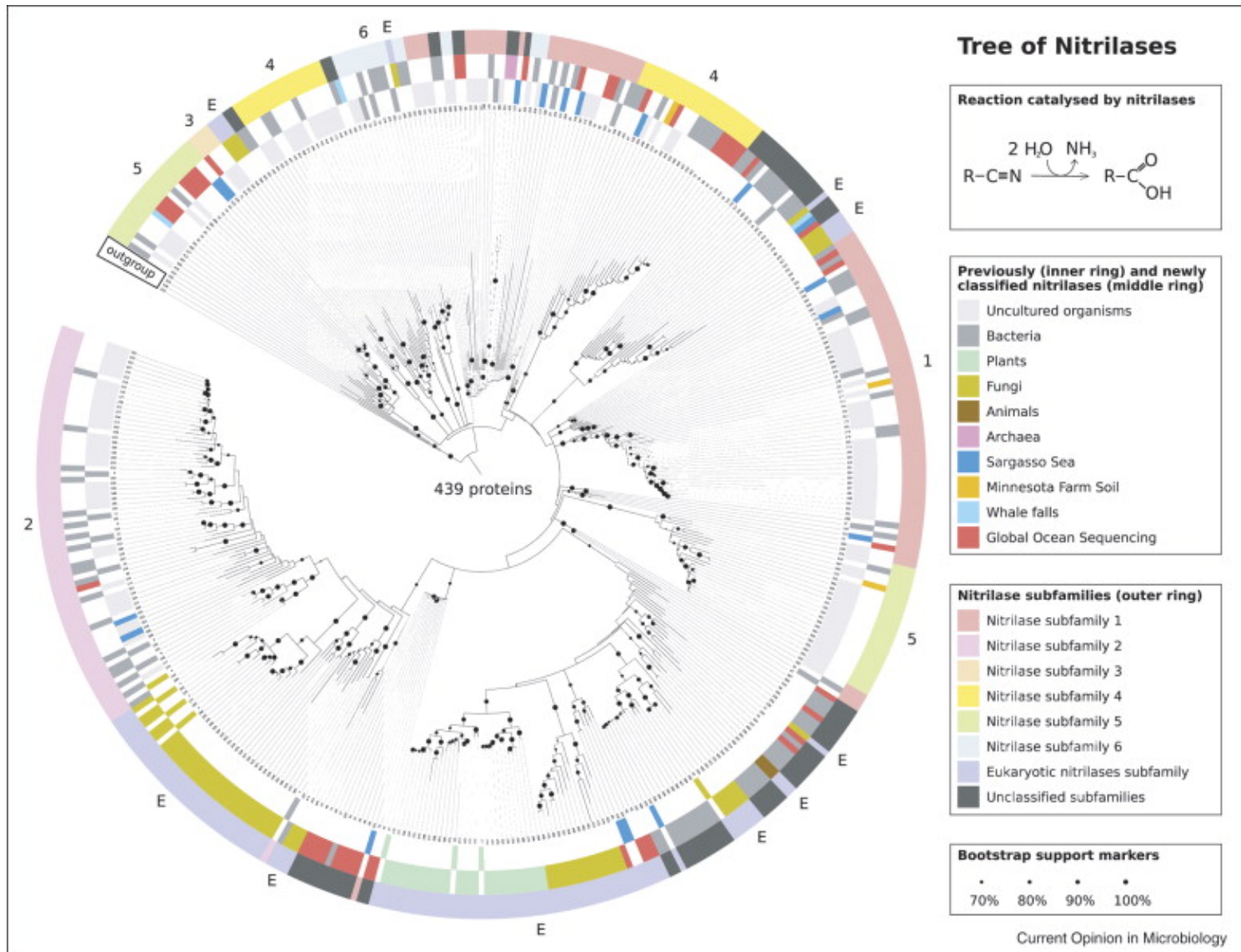




# Métodos Independentes de Cultivo



# Métodos Independientes de Cultivo



# Métodos Independentes de Cultivo

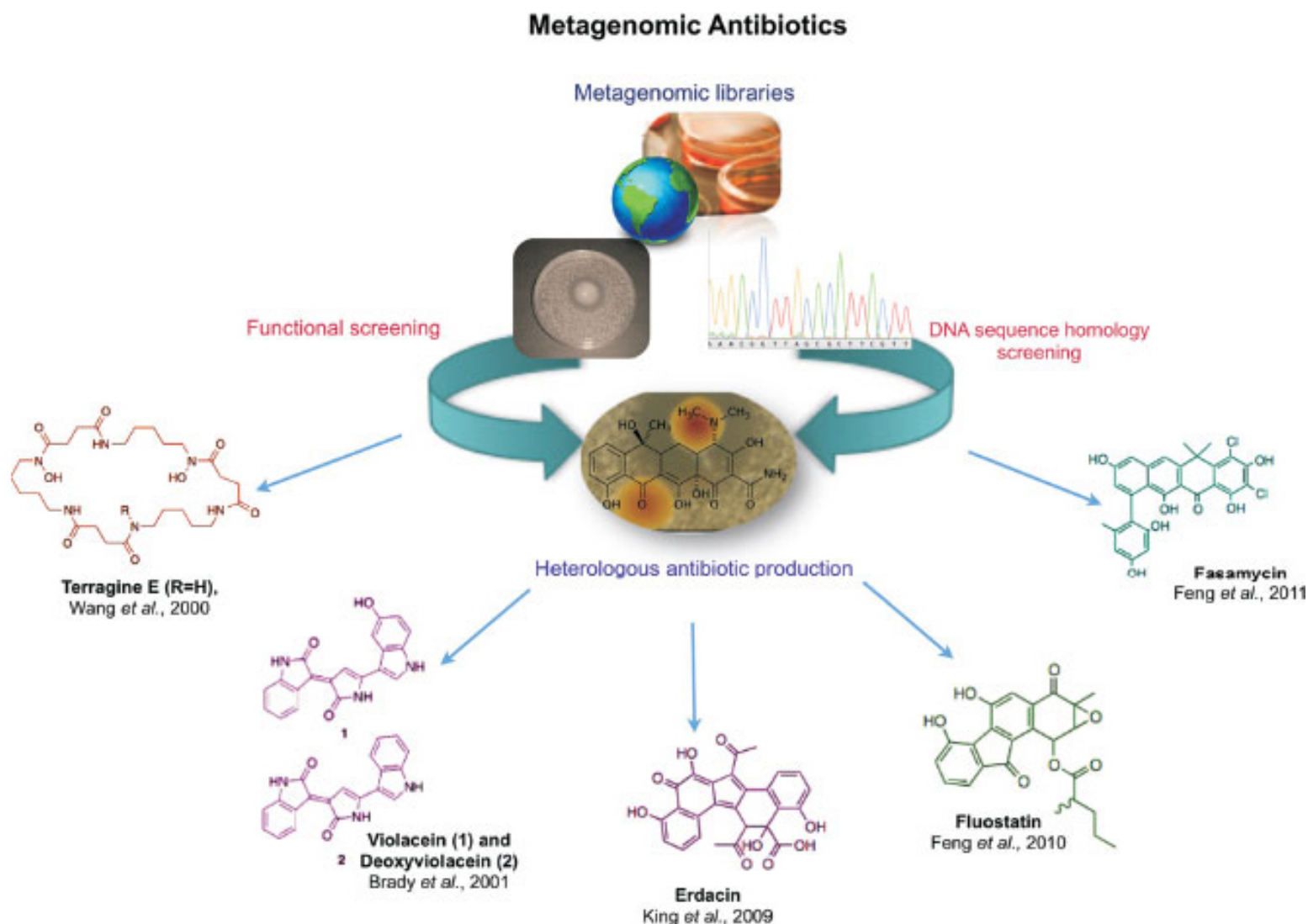


Figure 8 - Some metagenomic contributions to the discovery of new drugs.