



AULA 2- ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICRORGANISMOS

ROTEIRO 2: OBTENÇÃO DE CULTURA PURA

1- INTRODUÇÃO

Leveduras são microrganismos Eucariotos que usualmente habitam os vegetais e seus derivados ricos em glicídios. Apresentam grande interesse industrial para a elaboração de produto de biomassa, com mercado na produção de alimentos e de combustível.

2- OBJETIVOS

Isolar culturas puras leveduras a partir de amostras de habitats naturais de colonização como suco de uva e caldo de cana.

Manuseio adequado de técnicas de semeadura, repique e esgotamento com alça de inoculação.

3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

Material

- Alças de Drigalsky
- Alças de repicagem
- Pipetas
- Ponteiras de 10,0; 1,0 e 0,1 mL
- Garrafa para Solução salina (Cloreto de Sódio 1%)
- Amostras de Solo, Suco de Uva e Caldo de Cana
- Tubos de ensaio
- Placas de petri com meio de cultura sólido para cada grupo de microrganismo
- Tubos com meio de cultura líquido e sólido inclinado

Equipamento

- Estufa de Bacteriológica
- Fluxo Laminar
- Shaker



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

4- PROCEDIMENTO

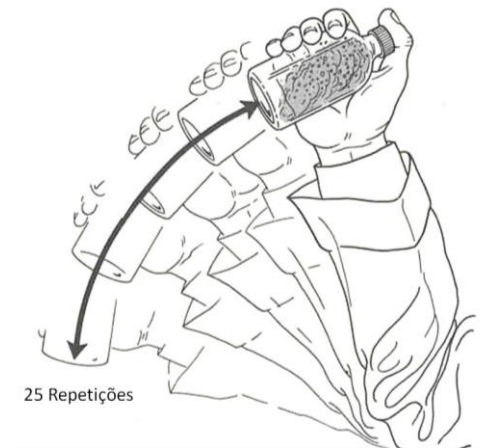
4.1 ISOLAMENTO DA LEVEDURA A PARTIR DE SUCO DE UVA OU CALDO DE CANA

1. Coletar 10,0 mL de **suco de uva ou caldo de cana** com ponteira estéril e adicionar na garrafa de diluição com 90 mL de solução salina estéril (Diluição 10^{-1});
2. Homogeneizar a amostra, agitando a garrafa a 30 °C por 30 minutos no *shaker* ou agitando manualmente aproximadamente 30X (Figura 1);
3. A partir da diluição 10^{-1} preparar diluições seriada de 10^{-2} , 10^{-3} , da amostra em solução salina nos tubos de ensaio (Figura 2). Cada tubo de ensaio deve conter 18 mL de salina +2 mL de amostra;
4. Espalhar 0,1 mL da amostra das diluições, em placa de Petri contendo meio nutritivo agar Levedura, com alça de Drigalsky estéril (Figura 3);
5. Lacrar e identificar a placa;
6. Incubar as placas invertida na estufa a 28 °C por 2 dias.
7. Após crescimento de colônias de leveduras **repicar** para o meio caldo Levedura, em tubo de ensaio;
8. Incubar a 28 °C por 2 dias;

Figura 1: Mistura manual da amostra em solução

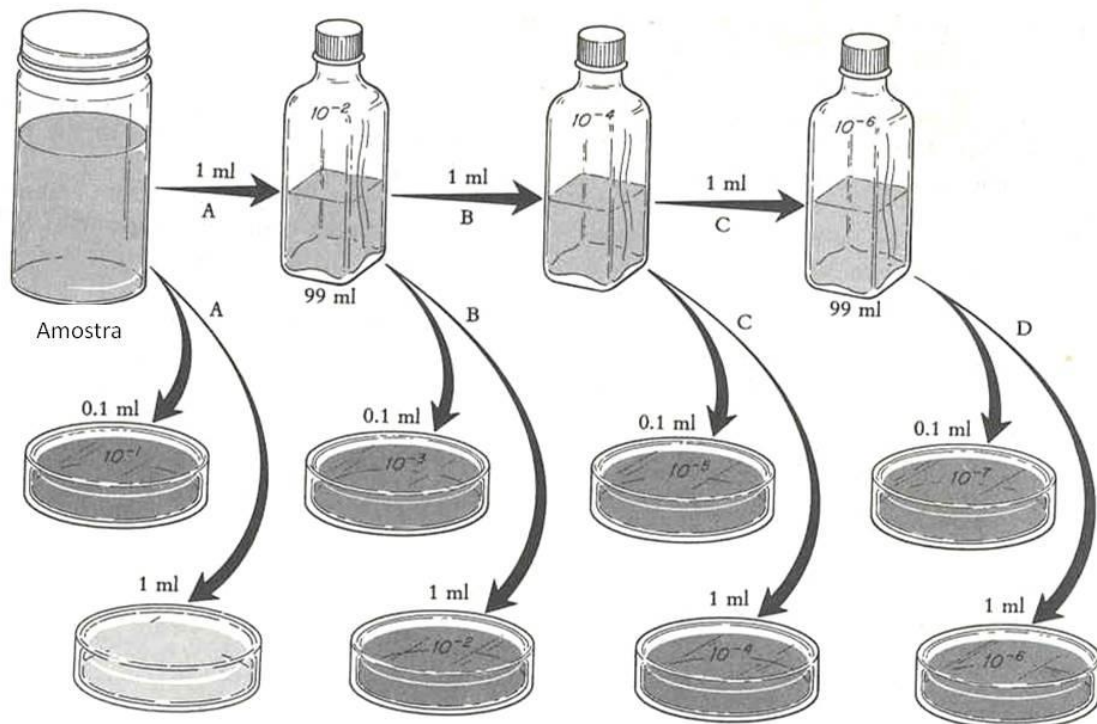


Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.

-Figura 2: Procedimento geral de diluição seriada para uso em técnica de semeadura em meio sólido.



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena -EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050



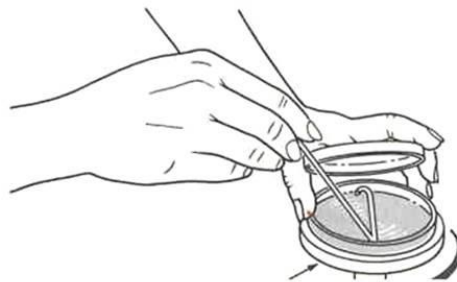
Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Figura 3: Semeadura em meio sólido.

(1) Pipete a amostra dentro da placa de petri



(2) Espalhe a amostra por toda a placa



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.

RESULTADOS: